

XXXI CURSO INTERNACIONAL DE EDAFOLOGIA Y BIOLOGIA VEGETAL

BIOMARCADORES EN SEDIMENTOS RECIENTES

Angela Mancha Jiménez, Julio de 1994

**Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS)
Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

INDICE

I.	INTRODUCCION.....	1
II.	TRABAJOS DE INVESTIGACION Y RESULTADOS.....	4
II.1.	TECNICAS Y PROTOCOLOS UTILIZADOS.....	4
II.2.	ANALISIS DE SEDIMENTOS DE ORIGEN DIVERSO Y DISCUSION DE LOS DATOS MAS RELEVANTES.....	9
II.2.1.	Orígenes y características de las muestras.....	9
II.2.2.	Parámetros fisicoquímicos.....	11
II.2.3.	Análisis de la composición mineralógica.....	14
II.2.4.	Análisis de componentes mediante GC y GC/MS.....	15
II.3.	RESULTADOS OBTENIDOS DE LA EXPERIENCIA DE CULTIVO.....	23
II.3.1.	Parámetros fisicoquímicos.....	25
II.3.2.	Composición mineralógica.....	31
II.3.3.	Composición lipídica.....	32
II.4.	Otros análisis de sedimentos acuícolas.....	48
III.	ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS.....	53
IV.	PREVISIONES DE FUTURO.....	56

I. INTRODUCCION

El presente Informe recoge los resultados de la labor investigadora desarrollada en el primer semestre de 1994, incluidos en un balance resumido del conjunto de actividades llevadas a cabo hasta ahora durante el tiempo de vigencia del Convenio (1992-1994).

Asimismo, se detallan en esta Memoria las actividades complementarias a la investigación en las que ha participado el personal científico adscrito al proyecto.

Por último se describen las actividades a realizar a corto plazo, y se sugieren líneas de actuación a más largo plazo, que permitirían aprovechar adecuadamente la experiencia adquirida en este tipo de estudios.

Este Proyecto de Investigación se inicia a la firma del Convenio en Junio de 1992, y no contaba con ningún tipo de antecedentes, si se exceptúa la amplia dedicación de los investigadores del IRNAS al estudio de la materia orgánica de suelos, residuos orgánicos y sedimentos carbonosos.

En el Plan de Trabajo diseñado se contemplaron dos tipos de actividades fundamentales a desarrollar en fases sucesivas:

- a) La caracterización y determinación de parámetros específicos en sedimentos que puedan tener un efecto limitante en el cultivo de especies concretas.
- b) La monitorización y diagnóstico de procesos degradativos de los sistemas acuícolas, del medio sedimentario en particular, como consecuencia de las prácticas de manejo de los mismos.

Entre los diversos componentes del sistema que mejor reflejan la calidad del mismo y la presión ambiental externa, se adoptó el SEDIMENTO como objeto prioritario de estudio, sin olvidar que las determinaciones en el mismo deben ser correlacionadas con las realizadas en la columna de agua y en la interfase agua-sedimento.

Durante la primera fase se hizo una prospección de áreas potenciales de estudio y se seleccionaron un conjunto de muestras, con el fin de optimizar los métodos y técnicas instrumentales de análisis.

Dicho muestreo se llevó a cabo en instalaciones acuícolas (parcelas experimentales de cultivos marinos en zonas abiertas y confinadas), y en zonas abiertas contiguas a los cultivos, como ríos y caños del entorno, todas ellas ubicadas en las instalaciones del Centro de Investigación y Cultivos de Especies Marinas "El Toruño", situado en El Puerto de Santa María, Cádiz. Se procuró hacer la elección atendiendo a la máxima variabilidad ambiental (en las condiciones de oxidación-reducción, flujos de agua, etc.) dentro de la natural homogeneidad del entorno, para asegurar que encontraríamos un amplio rango de valores en los diferentes parámetros que se estudiarían a lo largo del trabajo.

Entre las innovaciones metodológicas ensayadas destacan los estudios sobre métodos alternativos de derivatización y saponificación de los extractos lipídicos, que fueron comparados en eficacia con los métodos convencionales.

Los resultados de estos estudios se presentaron en los Informes de Progreso del segundo semestre de 1992 y del primer semestre de 1993.

En el primer semestre de 1993 se inició un estudio detallado de las variaciones que se producen en las características fisico-químicas y biológicas de los sedimentos, durante una experiencia de cultivo de especies marinas, diseñada por técnicos de Pemares.

Los resultados finales obtenidos en esta experiencia se resumen en el presente Informe, aunque más adelante serán objeto de discusión detallada y difundidos convenientemente.

Además de los descritos se han llevado a cabo otros trabajos de investigación relacionados también con la determinación de parámetros ambientales en sedimentos acuícolas, cuyos resultados se exponen también en esta Memoria.

II. TRABAJOS DE INVESTIGACION Y RESULTADOS

II.1. TECNICAS Y PROTOCOLOS UTILIZADOS

Se describen a continuación resumidamente los métodos experimentales utilizados en el análisis de los sedimentos acuícolas:

- Preparación de las muestras para el análisis

Se ha seguido la norma general de mantener los sedimentos congelados hasta el inicio de su preparación para los análisis. Para ello las muestras se congelaron a -20°C inmediatamente después de su toma en recipientes de cristal lavados con mezcla crómica, y se mantuvieron en la oscuridad para evitar posibles cambios en la materia orgánica, causados por fotooxidación o por acción bacteriana.

El primer paso tras la descongelación es la completa eliminación de agua, presente en mayor o menor medida en todas las muestras. Este proceso se ha llevado a cabo por liofilización para evitar las frecuentes alteraciones que provoca en la materia orgánica lábil el secado por encima de los 60°C . Por término medio, el secado por liofilización se realiza durante 24 horas.

Una vez secos se eliminaron manualmente componentes extraños (conchas de bivalvos en algunos de ellos), y se molieron en un mortero de cerámica. Finalmente se pasaron a través de un tamiz de 1 mm de luz de malla, suficiente para garantizar la homogenización de las muestras, aumentar la superficie de contacto y el rendimiento de las extracciones.

- Análisis de la fracción mineralógica

La caracterización de la fracción mineralógica de los sedimentos se realizó por difracción de Rayos X mediante el método del polvo cristalino, que se basa en la capacidad de los cristales para dispersar los RX. Las muestras ya liofilizadas y homogeneizadas se trituraron de nuevo en un mortero de ágata para conseguir un fino tamaño de partícula, requerido para este tipo de análisis. El equipo utilizado fue un Difractometro D-501 Modelo Siemens

- Determinación de Materia Orgánica Total (MOT), nutrientes y metales pesados

La MOT se ha determinado por los métodos de calcinación (a 550 C durante 16 horas) y oxidación con dicromato potásico.

Se ha realizado el análisis de los macronutrientes, micronutrientes y metales pesados por los métodos convencionales de análisis de suelos.

- Extracción y fraccionamiento de las fracciones lipídicas

Para el análisis de la fracción lipídica, que contiene la mayor parte de las familias de compuestos de orígenes diversos que pueden utilizarse como biomarcadores, se seleccionó el protocolo que se presenta en la fig 1.

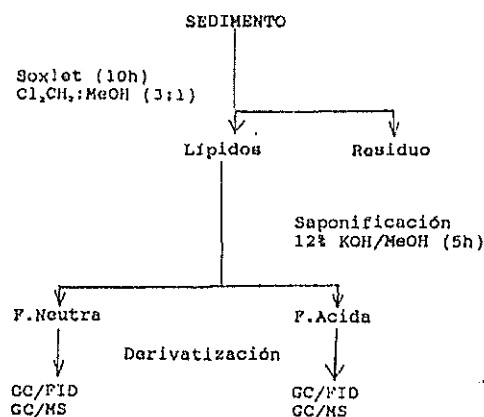


Figura 1

Aquellos extractos que presentaban precipitados y un color verdoso (indicativos de la presencia de pigmentos y esteroides de alto peso molecular) se purificaron mediante cromatografía de adsorción.

Para la determinación específica de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES), hemos adaptado a nuestras muestras un método de extracción y metilación "in situ" desarrollado recientemente para el análisis de material biológico. Dicho método consiste en calentar a 80°C durante 2 h una cantidad determinada de muestra junto con un reactivo específico formado por la mezcla siguiente: metanol-heptano-tolueno-2,2-dimetoxipropeno-H₂SO₄ (39:34:20:5:2 en vol.). Se deja enfriar la mezcla y se separan las dos fases obtenidas, quedando los ácidos metílicos de ácidos grasos en la fase de heptano.

- Separación e identificación de las mezclas de componentes mediante Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas.

Las separaciones se han llevado a cabo en columnas capilares de sílice fundida de 25 y 50 m de longitud (0.2 mm de diámetro interno), impregnadas de OV-101 instaladas simultáneamente en un Cromatógrafo de Gases Hewlet Packard 5890, con detector de ionización de llama (FID), y en el sistema GC-Espectrometría de Masas-Computador HP 5988.

El conjunto de parámetros seleccionados para la separación de las muestras de componentes se recoge en la tabla I.

	GC	GC/MS
Gas portador(N ₂)	1 ml/min	1 ml/min
Gas portador(He)		
Modalidad de inyección	splitless	
Temp. detector FID	350°C	
Temp. portal de inyección	250°C	
Purga del septum	2 ml/min	
Temp. inyección	50°C	
Temp. inicial T(1)	100°C	
Velocidad hasta T(1)	12°C/min	
tiempo a T(1)	0 min	
Temp. final T(2)	300°C	
tiempo a T(2)	15 min	
Velocidad hasta T(2)	6°C/min	
Modo de ionización		
Voltaje de ionización		
Voltaje del multiplicador		
Rango de masas		
Velocidad de barrido		
Umbral de detección de masas		
		Impacto electrónico
		70 eV
		2000 V
		40-600 mas
		850 mas/s
		200 cuentas

Tabla I. Condiciones cromatográficas utilizadas para la separación e identificación de componentes en los extractos lipídicos.

Para incrementar la volatilidad de los muchos componentes polares presentes en las fracciones ácida, tales como ácidos grasos, esteroides, etc., y facilitar su separación por columnas apolares, utilizables a altas temperaturas, es necesario recurrir a diversos métodos de derivatización. Los empleados en este trabajo han sido los siguientes:

* Metilación con diazometano: especialmente recomendado para metilar los grupos carboxílicos de ácidos grasos. El procedimiento consiste en hacer pasar diazometano etéreo producido "in situ", por una suspensión de la muestra a metilar en metanol hasta que ésta toma color amarillento. El diazometano se prepara haciendo reaccionar N-metil-N-nitros-p-toluen sulfonamida (diazald) con dietilenglicol-monometil-éter (carbitol) en un tubo de ensayo en medio alcalino. El proceso se repitió varias veces para asegurar una metilación completa de la muestra.

* Silanización con N,O-bis-(Trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA): se emplea para silanizar los grupos -OH de alcoholes, esteroides, etc. A la muestra a derivatizar se le añaden 0.5 ml de BSTFA y se agita hasta disolución. Antes de inyectar se calienta a 75 °C durante 20 minutos, se evapora la mezcla y se redisuelve en cloroformo.

La identidad de cada componente se determinó por comparación de sus espectros de masas con la de sustancias patrones inyectadas en las mismas condiciones, con los existentes en tablas (EPA/NIH Mas Spectral Data Base) y en las librerías del ordenador (NBS Spectra) o con espectros publicados anteriormente en la bibliografía. Componentes de algunas series homólogas fueron detectados mediante la técnica de monitorización de ión

simple (SIM, single ion monitoring), que permite visualizar en el barrido de masas sólo aquellos fragmentos característicos de determinadas clases de compuestos, lo que aumenta notablemente la sensibilidad del análisis.

II.2. ANALISIS DE SEDIMENTOS DE ORIGEN DIVERSO Y DISCUSION DE LOS DATOS MAS RELEVANTES

II.2.1 Origen y características de las muestras

Como se indicó en la Introducción, la primera fase del Plan de Trabajo consitió en el análisis de una serie de muestras de sedimentos de origen diverso. En el mapa de la figura 2, de la granja marina del CICEM "El Toruño" y su entorno próximo, se indican los puntos de muestreo.

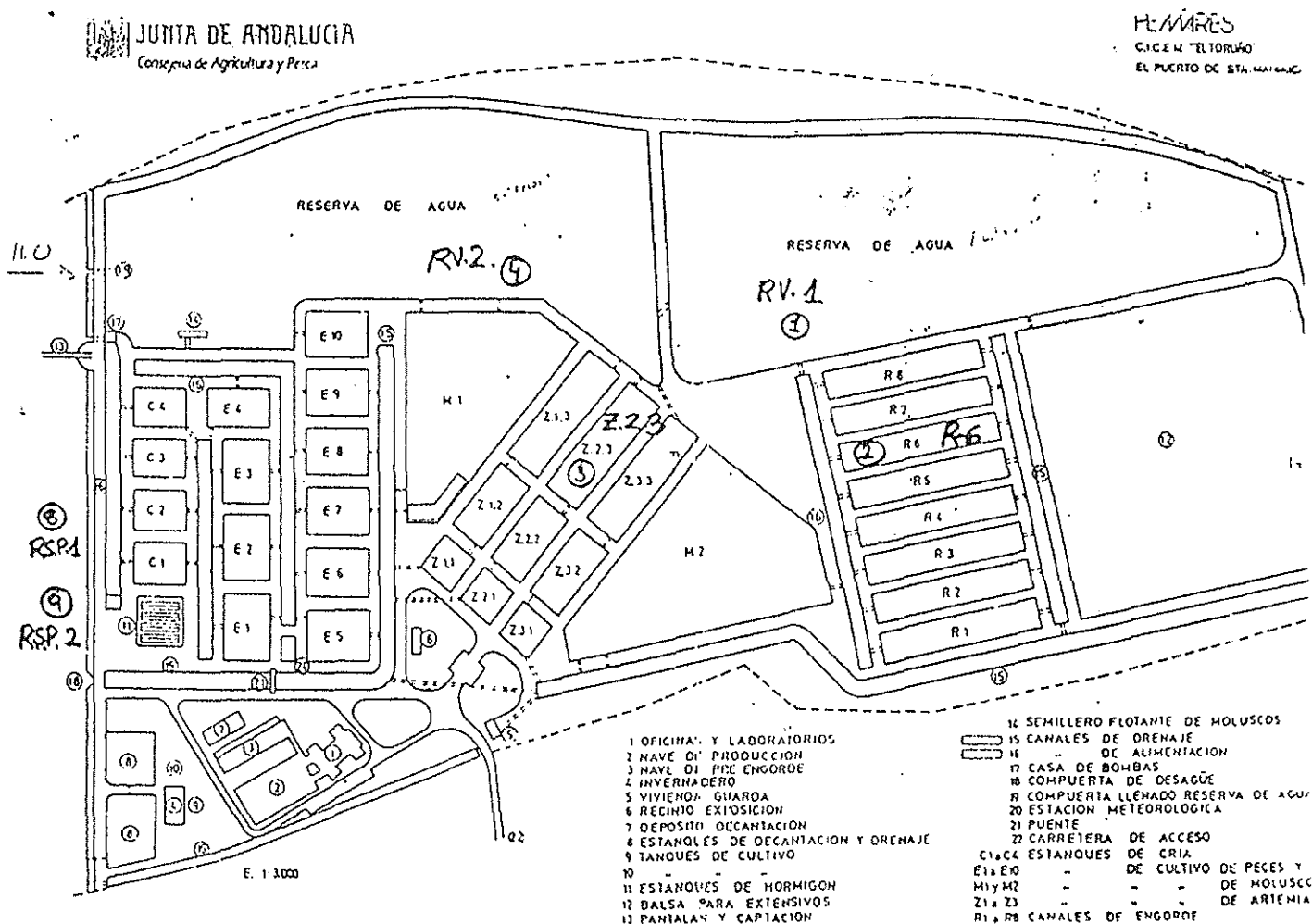


Figura 2.

Las muestras fueron tomadas en la superficie de los respectivos sedimentos (profundidad de hasta 10 cm como máximo), que es donde se encuentra la mayor parte de la materia orgánica de nuestro interés, tales como las acumulaciones de productos de desecho, de sobrealimentación, metabolitos, etc. Dos de las muestras, las situadas en el Río San Pedro, fueron tomadas con "core" a mayor profundidad, 20 cm, para compararlas con los respectivos sedimentos superficiales. En la tabla II. se detallan las características de cada una de las muestras.

Tabla II Características de las muestras.

MUESTRA	ORIGEN	DESCRIPCION	CARACTERISTICAS
1)RV.1.	Granja Pezares	Reserva interior de agua.	Sedimento seco y cuarteado, pero no arado.
2)R-6.	Granja Pezares	Canal de engorde.	Sedimento secado y arado. En la fecha de muestreo inundado por agua de lluvia y filtraciones de agua salada. No contiene ningún cultivo.
3)E.2.3.	Granja Pezares	Estanque de cultivo de almejas.	Sedimento secado arado y lavado antes de la siembra. Estanque sometido a flujo continuo de agua y tapizado por microalgas.
4)RV.2.	Granja Pezares	Reserva exterior de agua.	Reserva llena de agua permanentemente. La captación del agua se hace por bombeo del Río San Pedro.
5)F.1.	Caño de Sancti-Petri	Sedimento natural.	Muestra tomada en el nivel medio de la zona intermareal, y por tanto sometida a periodos secos (horas).
6)F.2.	Caño de Sancti-Petri	Sedimento natural.	Muestra tomada en el nivel inferior de la zona intermareal, por lo que raramente se descubre con las mareas. Durante todo el año se encuentra tapizado de <i>Caularia prolifera</i> .
7)T.	Caño de Sancti-Petri	Sedimento transformado con arena en N-D 90.	Muestra tomada en el nivel medio de la zona intermareal. Ha sido cultivado una sola vez. Se ha mezclado el fango original con arena añadida. Se aprecia gran cantidad de <i>Cerastoderma sp.</i>
8)R.SP.1.	Río San Pedro	Sedimento transformado en 1988.	Muestra tomada en el nivel medio de la zona intermareal. Desde hace tres años no hay cultivo. El fango natural está mezclado con el sustrato añadido. Se aprecia gran cantidad de <i>Scrobicularia plana</i> y poliquetos. Muestra tomada en la superficie.
9)R.SP.2.	Río San Pedro	Sedimento natural.	Muestra tomada en el nivel medio de la zona intermareal. Muestra tomada en la superficie.
10)R.SP.1.C.	Río San Pedro	Sedimento transformado en 1988.	Muestra tomada en el nivel medio de la zona intermareal. Desde hace tres años no hay cultivo. El fango natural está mezclado con el sustrato añadido. Se aprecia gran cantidad de <i>Scrobicularia plana</i> y poliquetos. Muestra tomada a 20 cm de profundidad.
11)R.SP.2.C.	Río San Pedro	Sedimento natural.	Muestra tomada en el nivel medio de la zona intermareal. Muestra tomada a 20 cm de profundidad.

II.2.3. Parámetros fisicoquímicos.

En la tabla III se presentan los resultados de la determinación de Materia Orgánica Total (MOT) por el método de calcinación y por vía húmeda (método de la oxidación con dicromato) y los valores de pH y contenido en carbonatos.

Tabla III. Porcentajes de MOT calculados por calcinación y por oxidación con dicromato, de carbonatos y contenido en pH de las muestras de sedimentos de origen diverso.

Muestra	MOT por calcinación (%)	MOT por oxidación (%)	Carbonato (%)	pH
1)RV.1.	9.84	1.60	13.4	7.60
2)R-6.	9.25	1.90	12.5	7.80
3)Z.2.3.	10.85	1.34	19.4	8.00
4)RV.2.	8.83	1.41	18.6	7.80
5)F.1.	7.30	2.07	11.0	8.00
6)F.2.	6.78	2.78	14.5	8.00
7)T	10.98	1.55	18.9	8.20
8)R.SP.	10.94	2.07	16.4	8.10
9)R.SP.	6.06	0.79	17.0	8.20
10)R.SP.1.C	5.06	1.48	17.7	8.30
11)R.SP.2.C	4.66	1.17	19.5	8.40

RV: reserva de agua
R y Z: estanques productivos
F: canal de Sancti Petri
RSP: Río San Pedro

Como es de esperar para este tipo de sedimentos, se observa que los valores obtenidos utilizando el método de calcinación son entre 5 y 10 veces más elevados que los obtenidos con el método del dicromato. Esto se debe a que en el porcentaje de C orgánico total, determinado por calcinación, se incluyen fracciones de C inorgánico (carbonatos principalmente) y C orgánico "inerte" a la oxidación presente en bio-geolípidos de elevado peso molecular. La potencial gran variabilidad de las contribuciones de estas formas de C a la MOT, explica asimismo que no exista una correlación directa entre ambos grupos de valores.

Refiriéndonos exclusivamente a los datos de MO oxidable, los de mayor interés para nuestro trabajo, se observa que las

muestras de sedimento natural muestreadas en distintos puntos de la zona intermareal en el Caño de Sancti-Petri (F.1. y F.2.) presentan los contenidos más elevados de MO. Cuando este sedimento se transforma con arena (muestra T) el contenido de MO es lógicamente menor. Esta tendencia se invierte cuando la transformación del sedimento se realiza con un sustrato orgánico, como se observa claramente en los sedimentos del Río S. Pedro, de los cuales el sedimento natural (RSP 2) presenta un valor muy inferior (0,79 %) al transformado (2.07 %). No existe una explicación clara al hecho de que en estos sedimentos se invierta la tendencia al considerar las muestras tomadas a distintas profundidades, es decir, que en el sedimento transformado es mayor el contenido en MO en la superficie, mientras que en el natural ocurre al revés.

Los demás sedimentos presentan valores normales de MOT, aunque es de señalar que no sea más elevado el contenido del estanque Z.2.3., que estaba tapizado de microalgas.

En la tabla IV se presentan los contenidos en macronutrientes, oligoelementos y metales pesados, de las diversas muestras de sedimentos muestreadas originalmente.

MUESTRA	N %	P %	K %	Ca %	Mg %	Na %	Fe (ppm)	Mn (ppm)	Zn (ppm)	Cu (ppm)	Cr	Ni
1)RV.1.	0.09	0.09	3.1	7.3	2.17	1.95	49080	1298	88	46	116	68
2)R-6	0.06	0.06	1.8	9.1	1.69	3.20	27608	1084	35	27	60	42
3)Z.2.3.	0.08	0.04	2.2	8.2	0.18	1.19	2968	495	83	36	63	42
4)R.V.2.	0.10	0.04	1.5	9.5	0.14	1.47	20842	388	73	24	40	26
5)P.1.	0.08	0.04	1.5	1.3	5.23	0.10	14167	162	57	19	27	19
6)P.2.	0.15	0.10	2.3	7.1	1.43	1.82	37106	520	78	43	88	49
7)T	0.10	0.06	1.5	8.1	0.12	1.33	18353	202	69	26	37	26
8)R.SP.1.	0.15	0.06	1.5	9.9	0.13	1.67	21338	431	91	36	44	27
9)R.SP.2.	0.05	0.04	1.3	7.9	0.08	1.26	16751	277	60	24	34	23
10)R.SP.1.C	0.06	0.04	1.2	8.3	0.82	0.92	16501	613	20	22	41	25
11)R.SP.2.C	0.06	0.04	1.2	9.5	0.91	1.59	17027	615	36	21	41	29

Tabla IV. Contenido en macronutrientes (%), micronutrientes (ppm) y metales pesados (ppm) de las muestras de sedimentos de origen diverso.

En la tabla V se presentan los porcentajes de extractos totales de lípidos, y el reparto de los mismos en las subfracciones neutra y ácida.

Tabla V. Porcentajes del extracto lipídico y su distribución en fracciones ácidas y neutras, todo referido al peso de MOT.

MUESTRA	EXTRACTO	F. NEUTRA	F.ACIDA
1) R.V.1.	11.96%	51%	48%
3) Z.2.3.	2.40%	20%	80%
4) RV.2.	8.43%	70%	30%
5) F.1.	2.90%	60%	40%
6) F.2.	11.70%	52%	46%
7) T.	11.09%	55%	45%
8) R.SP.1.	10.38%	40%	60%
9) R.SP.2.	6.37%	82%	18%
10) R.SP.1.C.	10.32%	65%	35%

Se observan, en general, valores relativamente elevados en comparación con las proporciones de lípidos en sedimentos terrestres, incluyendo suelos, que raramente superan el 1 %. En este sentido, son un buen ejemplo los casos de las reservas interior y exterior de agua. Por otra parte, es de destacar la variabilidad de valores entre los diferentes sedimentos, que reflejan la diferente importancia de las contribuciones orgánicas al material acumulado en la superficie.

Comparando los contenidos de diversas muestras, es de resaltar como el sedimento natural del caño de Sancti Petri, muestreado en la zona intermareal sujeta a periodos secos (F.1), contiene una proporción de lípidos muy inferior a la del mismo sedimento inundado y cubierto de algas (F.2). Cabría esperar por

II.2.3. Análisis de la fracción mineralógica.

En los diagramas de la figura 3 se presenta el análisis de la composición mineralógica de las muestras de sedimentos del estanque de cultivo de almejas (Z.2.3.) y del sedimento natural del Caño de Sancti-Petri (F.1.), los cuales son representativos de todos ellos.

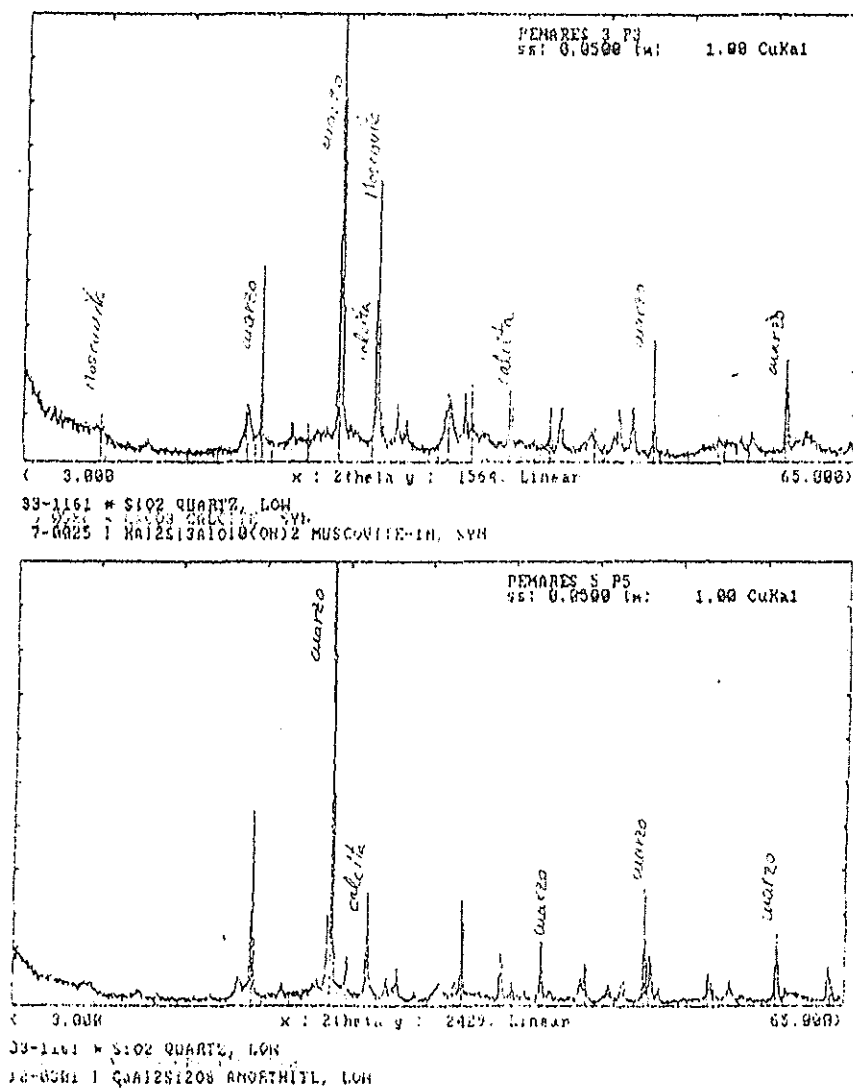


Figura 3.

Los minerales presentes en los sedimentos fueron los mismos en todos los casos: Cuarzo (57-70%), Carbonatos (20-40%), Feldespato (5-10%) y trazas de Anortita y Mica.

esta misma razón una mayor riqueza lipídica en el estanque Z.2.3., que no se produce probablemente por el efecto de arrastre del flujo continuo de agua al que está sometido. En cuanto a las muestras de sedimentos del Río S. Pedro, el sedimento mezclado con sustrato (RSP.1) es más rico en material lipídico que el sedimento natural (RSP.2). En ninguno de ellos se apreció apenas diferencias en contenido lipídico entre las muestras tomadas en la superficie y a 20 cm.

El reparto de los extractos totales en subfracciones ácida y neutra ofrece una primera aproximación cualitativa a la naturaleza de los componentes mayoritarios en cada extracto.

Se observan, sin embargo, algunos valores de difícil explicación. Mientras las muestras de sedimentos de Sancti-Petri se comportan de forma similar, y contienen fracciones neutras en ligera mayor proporción que ácidas, los extractos lipídicos de los sedimentos muestreados en el Río S. Pedro se no se comportan linealmente, ni entre ellos, ni respecto de los niveles muestreados. Es de destacar, en fin, la elevada proporción de fracción ácida del extracto del estanque Z.2.3.

II.2.4. Análisis de componentes mediante GC y GC/MS.

* Fracciones neutras

En la figura 4 se presentan los Cromatogramas de Ion Total (TIC) representativos de las fracciones neutras de los diferentes extractos lipídicos. La naturaleza química de los compuestos identificados se indica con diferentes letras en cada uno de los picos cromatográficos. En la tabla VI se detalla la composición de las diferentes series homólogas y componentes individuales identificados.

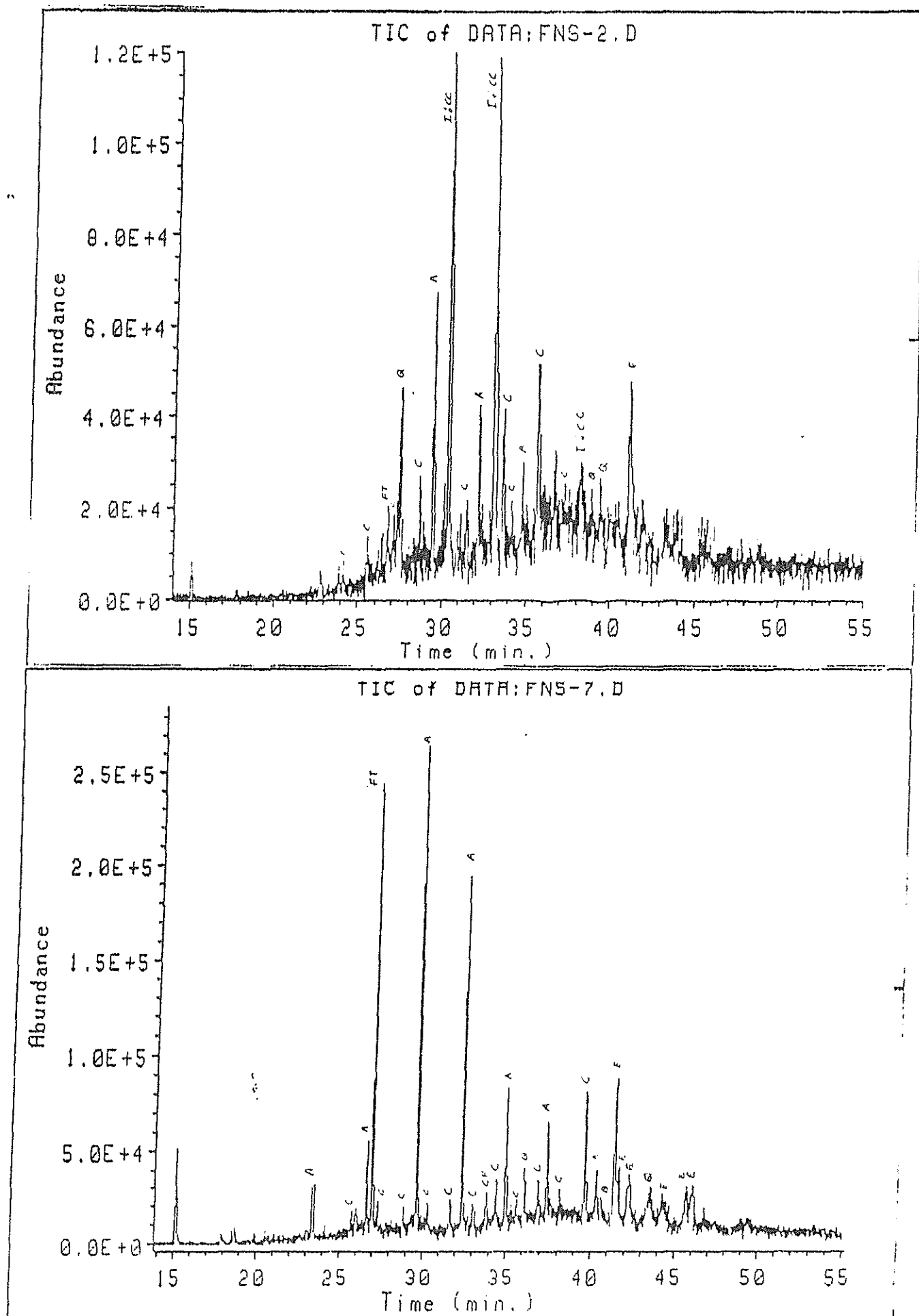


Fig.4. Cromatograma de Ion Total de las fracciones neutras de las muestras del Canal de engorde (a) y del sedimento transformado con arena del Caño Sancti-Petri (b).

Tabla VI. Composición de las Fracciones Neutras.

	n-Alcanos	Insat/ Cicloalc	Alcoholes primarios	Fitol	Esteroles (1)	Otros (2)
1)RV.1.	18-31	+	16-30	-	C,Cn,B,Es, BS,BSn	+
2)R-6.	20-30	+	20-24	+	C,Cn	+
4)RV.2.	20-31	+	16-28	+	C,Cn,B,Es, BS,BSn	+
5)F.1.	22-30	-	18-24	-	C	+
6)F.2.	20-31	+	16-28	+	C,Cn,B,Es, BS,BSn	+
6S)F.2.	22-31	+	22-28	+	C,Cn,B,BS	+
7)T.	21-31	+	16-28	+	C,Cn,B,Es, BS,BSn	+
8)R.SP.1.	21-31	+	14-28	+	C,Cn,B,Es, Cp,BS	+
9)R.SP.2.	19-31	-	16-22	+	C,Cn,B,Cp, Es,BS,BSn	+
9S)R.SP.2.	19-31	-	14-32	+	C,Cn,B,Cp, Es,BS,BSn	+
10)R.SP.1.C	24-31	+	20-28	+	C,Cn,B,Cp, Es,BS,BSn	+

(1) C: Colesterol
 Cn: Coestanol
 B: Brassicasterol
 Cp: Campesterol
 Es: Estigmasterol
 BS: β -Sitosterol
 BSn: β -Sitostanol

(2) Alquenos
 Alcoholes ramificados
 Desconocidos. En proceso de identificación.

La serie de n-alcanos en el intervalo C18-C31 es predominante en todas las muestras, con pequeñas variaciones de unas a otras. En los sedimentos tomados a distintas profundidades es clara la mayor abundancia de n-alcanos en la superficie.

En aquellas muestras donde la contribución algal es evidente (estanque Z.2.3., sedimentos del caño Sancti-Petri y del Río S.

Pedro) se han detectado en cantidades traza (con ayuda del SIM) homólogos de menor peso molecular, principalmente el C17. Los componentes mayoritarios en todas las muestras son los homólogos que van del C29 al C31, con la típica distribución de n-alcenos en plantas superiores, lo que indica la contribución prioritaria de éstas a la MO acumulada.

Hidrocarburos insaturados y cicloalcenos, típicos representantes del fitoplacton, se han detectado en prácticamente todas las muestras.

En todas las muestras analizadas aparecen alcoholes primarios desde el C14 al C30, aunque con diferentes distribuciones. Las contribuciones a estos compuestos son muy variables. Así, la serie C14-C24 es típica de invertebrados, la C14-C18 de microorganismos y la C26-C34 de plantas superiores, por lo que no es fácil discernir en las muestras individuales el grado en que intervienen las posibles fuentes, aunque, de nuevo, parece predominar en todas las muestras la contribución de plantas. Es de destacar la detección en todas las muestras del fitol, típico producto de la diagénesis de clorofila y algunas especies de bacterias, que se asocia a la contribución de fitoplancton.

Al igual que ocurría en los n-alcenos, se observa que las muestras tomadas en la superficie presentan mayor abundancia de n-alcoholes que las tomadas en profundidad.

Los esteroides detectados en las diferentes fracciones neutras son muy similares en todas ellas, y pueden proceder de muy distintas fuentes, tales como fitoplacton, algas, tejidos de animales, plantas superiores, etc.

* Fracciones ácidas.

En las figura 5 se presentan los Cromatogramas de Ion Total (TIC) representativos de las fracciones ácidas de los extractos lipídicos de las muestras. La identidad de los diferentes componentes individuales, indicada en cada pico, se detalla en la Tabla VII.

Tabla VII. Composición de las Fracciones Ácidas.

	Acidos grasos: Sat. Insat. Ramif.			w-Hidroxiácidos	Alcoholes primarios	Pitol	9,10- Dioles	Esteroles (1)
1)RV.1.	14-30	16,18	16	16-26	16-22	+	---	C,B,Cp
3)Z.2.3.	14-28	16,18	15	21-24	14-22	+	---	C
4)RV.2.	14-28	16,17	15,17	20-24	---	+	---	---
5)F.1.	14-26	16,18	15,17	15-23	18-20	---	---	---
6)F.2.	14-28	16,17 18	15,17	19-23	18-22	+	---	C
6S)F.2.	14-28	16,17 18	15,17	19-23	20	+	---	C
7)T.	14-27	16,18	15,17	22-24	16-22	---	---	C
8)R.SP.1	14-27	16,17 18	15,17	22-24	20	---	---	C
9)R.SP.2	14-26	16,17 18	15,17	17	16-20	+	---	---
9S)R.SP.2	14-26	16,17 18	15,17	---	20	---	16,18	---
10)R.SP.1.C	14-27	16,18	15,17	22-24	16-20	---	---	C
11)R.SP.2.C	14-28	16,18	15,17	---	16-20	+	16	---

(1) C: Coolesterol
B: Brassicasterol
Cp: Campesterol

Los componentes mayoritarios son los ácidos grasos, que se presentan en forma saturada preferentemente, aunque también se detectan homólogos insaturados y ramificados. En todas las fracciones ácidas se detecta la serie C14-C30 de n-ácidos grasos y el ácido graso ramificado C15.

El potencial origen de esta serie de ácidos grasos es múltiple, ya que son conocidos componentes del fitoplacton, tejidos de animales, bacterias y plantas superiores. Así, los

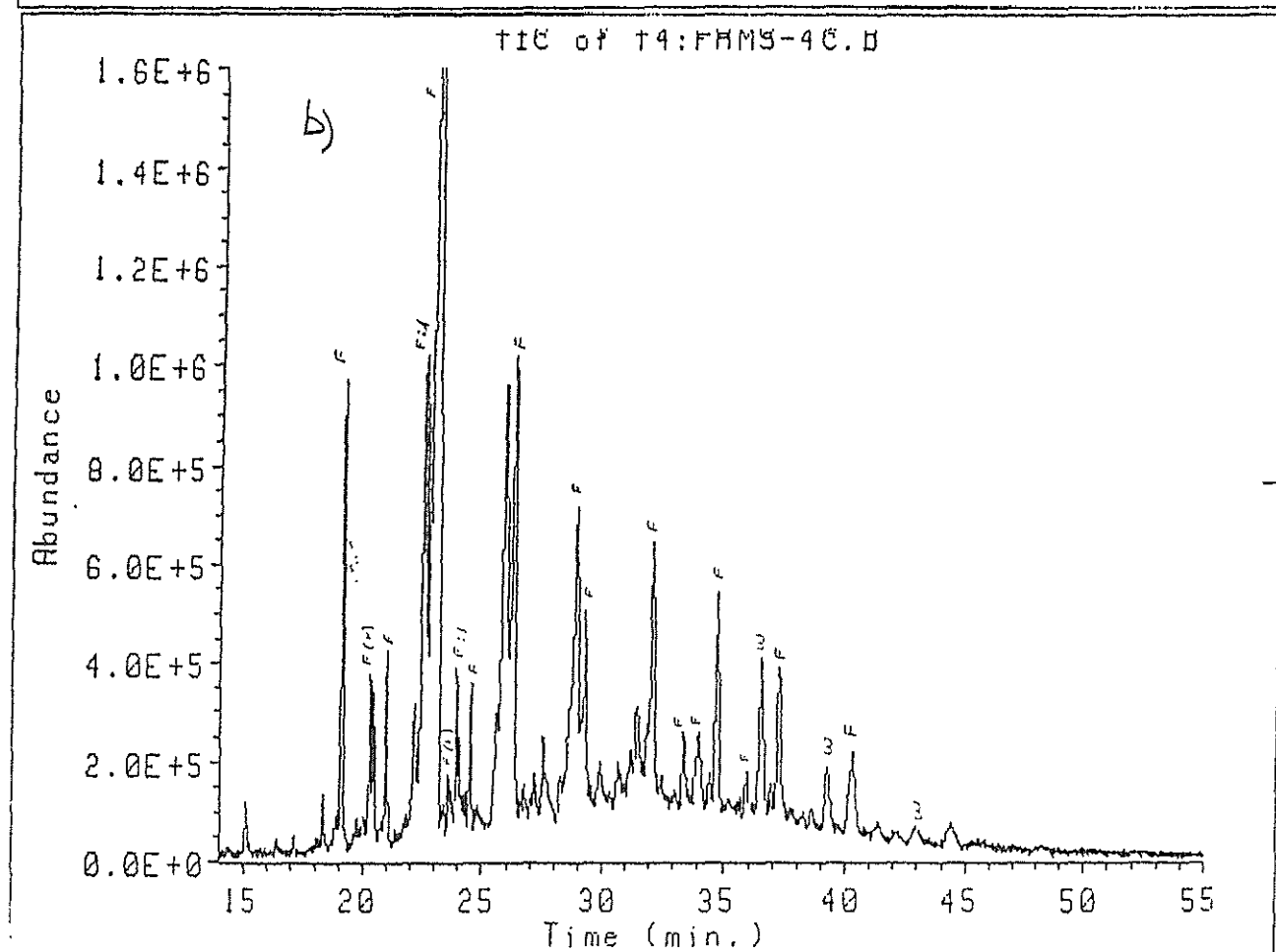
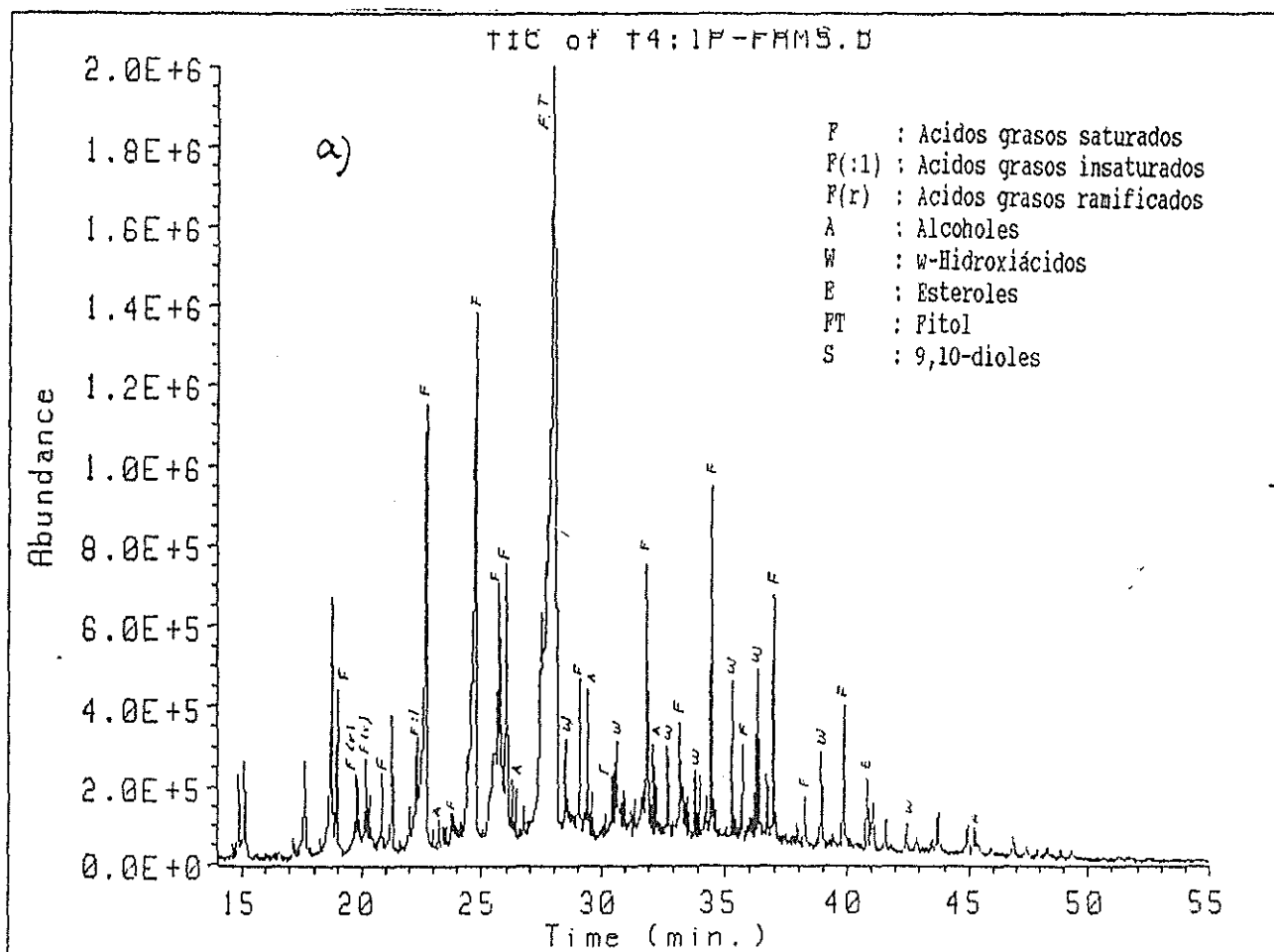


Fig. 5 Cromatogramas de Ion Total de las fracciones ácidas de las muestras de reserva interior (a) y de reserva exterior (b).

saturados de número par de átomos de carbono, desde el C12 al C24, pueden formar parte de los cuatro grupos citados; los monoinsaturados de número par de átomos de carbono desde el C12 al C24, solo forman parte de los tres grupos primeros y los de número impar de átomos de carbono, desde el C13 al C23 se encuentran principalmente en las bacterias, aunque también aparecen en animales y fitoplacton.

En todas las fracciones ácidas aparecen w-hidroxiácidos desde el C16 hasta el C24, excepto en algunas muestras tomadas en el Río S. Pedro, donde sólo se ha detectado el homólogo C17 (9.R.+SP.2.) o ninguno (id tomada a 20 cm.).

Los hidroxiácidos son típicos componentes de bacterias, aunque también se pueden encontrar en fitoplacton, tejidos de animales y plantas superiores en cantidades traza.

Se presentan en la figura 6 los espectros de masa representativos de los picos mayoritarios de los diferentes cromatogramas.

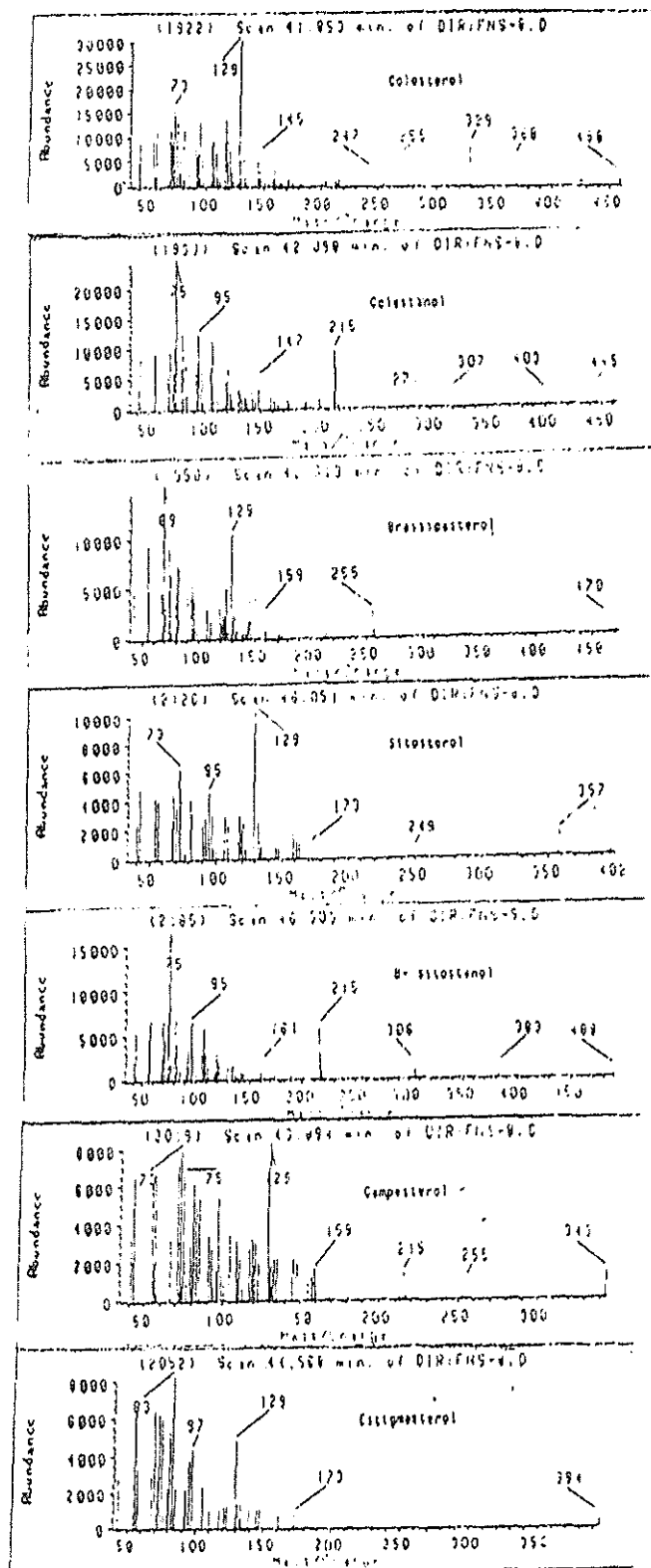
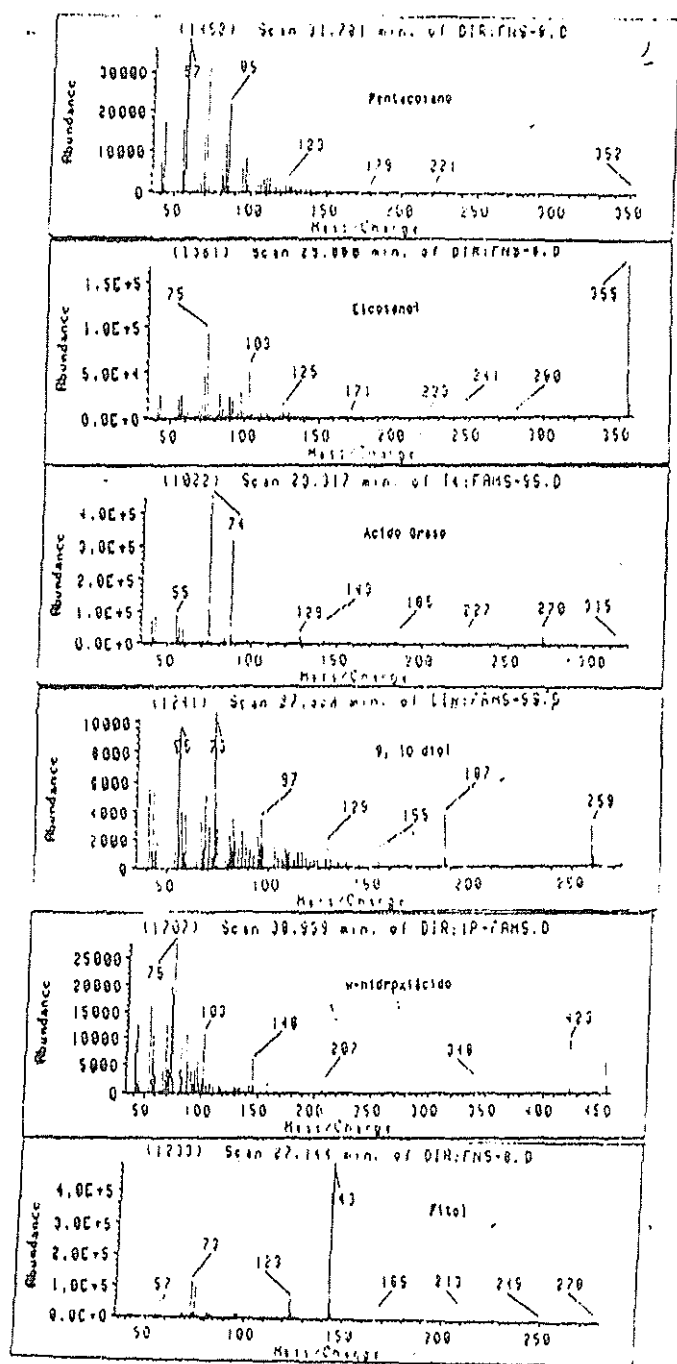


Figura 6. Espectros de masas de distintos compuestos.

II .3. RESULTADOS OBTENIDOS DE LA EXPERIENCIA DE FERTILIZACION

En el primer semestre de 1993 se inició la segunda fase del Plan de Trabajo, que ha consistido en la monitorización de parámetros físico-químicos en sedimentos acuícolas sometidos a una experiencia programada para evaluar la eficacia de la fertilización bentónica, en el cultivo semiextensivo de peces y crustáceos. En particular, se ha prestado especial atención a la influencia del citado manejo sobre las características de la fracción orgánica de los sedimentos.

Para realizar la experiencia se seleccionaron los ocho estanques R de la granja marina del CICEM "El Toruño" (ver figura 2). Estos estanques se encuentran situados paralelamente, uno junto a otro sobre el mismo tipo de terreno y tienen iguales dimensiones. Todos reciben el mismo manejo de agua procedente de un canal de entrada, el cual se alimenta de una reserva de agua, precedida a su vez por otra, que toma agua del Río San Pedro (brazo de mar que penetra tierra adentro). Debido a que la "historia" de utilización de cada uno ha sido diferente, fue necesaria la caracterización por separado de todos ellos.

La especie elegida por los técnicos de PEMARES para el cultivo fue *Peneus japonicus*, y el fertilizante utilizado fue un pienso granulado, empleado en la alimentación de carpas y añadido a los estanques con una tasa de 1gr/m₂/día.

Los muestreos iniciales y finales de sedimentos (tanto de la superficie como a más profundidad) fueron realizados en los meses de Marzo y Octubre de 1993. El diseño de la experiencia, elaborado por personal técnico de PEMARES, se resume de la siguiente forma:

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
Fertilización	*	*	*	*				
Cultivo		*	*		*		*	

Existieron, por tanto, cuatro tratamientos distintos con dos replicas cada uno:

- Fertilizados, sin cultivar: R1, R4
- Fertilizados, cultivados: R2, R3
- Sin fertilizar, sin cultivar: R6, R8
- Sin fertilizar, cultivados: R5, R7

En lo sucesivo nos referiremos a los distintos tratamientos con las siguientes denominaciones: AGUA (A) (R6 Y R8), FERTILIZACION (F) (R1 Y R4), CULTIVO (Cu) (R5 Y R7) y FERTILIZACION+CULTIVO (F+Cu) (R2 Y R3). En el primero de ellos se evalúa exclusivamente la influencia del manejo de agua que han experimentado todos los estanques, y que consistió en una renovación diaria, en una tasa entre el 10 y el 15% de su capacidad.

Los datos de cada uno de estos tratamientos se han comparado con los de una muestra CONTROL (C), definida mediante tratamiento estadístico de los valores que presentaban todos los estanques antes de iniciarse la experiencia.

El tratamiento analítico al que se han sometido las muestras de sedimentos analizadas en esta experiencia es el descrito en el apartado II.1. La única innovación metodológica introducida son los tratamientos adicionales para la eliminación de pigmentos que dificultan el análisis cromatográfico, realizados en algunos extractos totales y subfracciones ácidas. El procedimiento consiste básicamente en retener el extracto total por una columna de alúmina neutra, y eluir posteriormente con diclorometano.

II .3.1 Parámetros fisicoquímicos.

En la tabla VIII se presentan los valores resultantes del tratamiento estadístico de los datos obtenidos para diferentes parámetros físico-químicos, en las muestras de sedimentos CONTROL y en los cuatro tratamientos realizados.

Un buen número de parámetros, tales como pH y carbonatos, algunos oligoelementos (Zn, Cu, Cr y Ni), y algunos macronutrientes (K, Ca y Mg), no experimentan variaciones significativas, aunque en estos últimos se observa un ligero aumento en los estanques no fertilizados (A y Cu), frente a los que si lo estaban (F y F+Cu), tal como se aprecia en la figura 8. Los contenidos en Fe y Mn de los sedimentos experimentan modificaciones significativas, pero siguiendo tendencias divergentes, como se aprecia en los correspondientes histogramas (figura 8).

En el caso del contenido en Cd, éste aumenta en todos los casos después de la experiencia, siendo mayor el aumento en los estanques cultivados (Cu y F+Cu), como se aprecia en los histogramas de la figura 9.

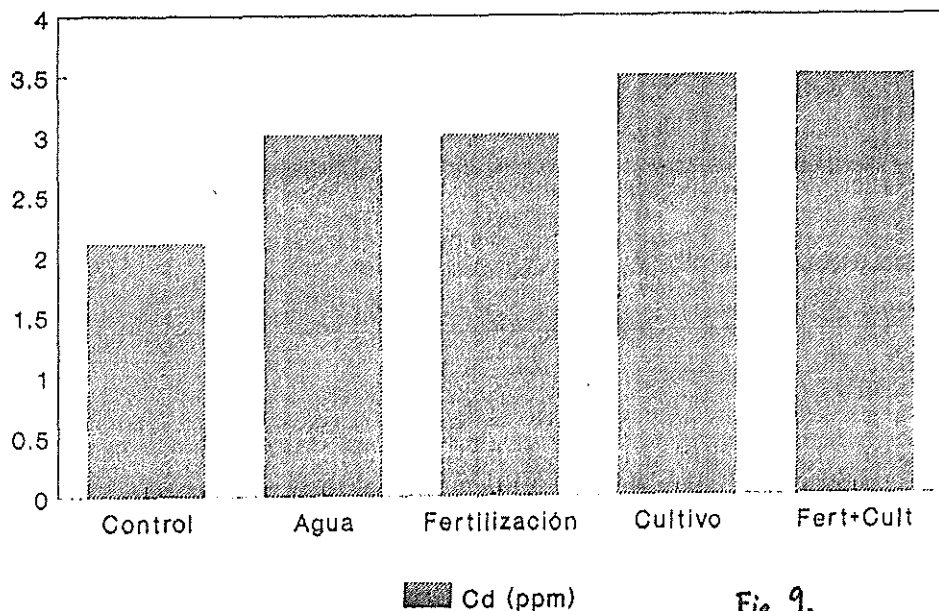


Fig. 9.

Tabla VIII. Valores de los parámetros medidos, en el estanque control y en los cuatro tratamientos realizados. (**)

	C		A		F		Cu		F + Cu	
MOT (%)	2.7	b	1.5	a	1.4	a	1.6	a	1.3	a
EL (%) (*)	10	a	15	ab	12	a	13	a	25b	
Neu (%)	74	b	80	b	46	a	76	b	71	ab
Aci (%)	26	a	20	a	54	b	24	a	29	ab
pH	7.8	b	7.3	a	7.7	ab	7.7	ab	7.8	b
CO ₂ (%)	14	a	17	a	16	a	15	a	17	a
CE (dS/m)	27	b	15	a	16	a	16	a	16	a
N (%)	0.12	a	0.01	a	0.08	a	0.01	a	0.08	a
P (%)	0.07	b	0.07	b	0.06	a	0.07	b	0.06	a
K (%)	2.1	a	2.6	a	2.0	a	2.5	a	2.1	a
Ca (%)	8.6	a	8.8	a	8.2	a	8.7	a	7.6	a
Mg (%)	2.3	a	2.4	a	1.9	a	2.4	a	1.9	a
Na (%)	4.3	b	2.2	a	2.3	a	2.9	a	2.0	a
Fe (ppm)	29830	ab	36530	b	26580	a	34950	ab	28530	ab
Mn (ppm)	854	a	576	a	435	a	758	a	495	a
Zn (ppm)	88	a	77	a	55	a	64	a	50	a
Cu (ppm)	23	a	23	a	22	a	29	a	22	a
Cr (ppm)	73	a	69	a	59	a	76	a	61	a
Ni (ppm)	42	a	44	a	36	a	43	a	38	a
Cd (ppm)	2.1	a	3	ab	3	ab	3.5	b	3.5	b

C: estanque control

A: estanques solo con agua

F: estanques fertilizados

Cu: estanques cultivados

(*) EL: extracto lipídico

(**) Los valores seguidos por diferentes letras en las mismas filas, difieren significativamente ($P < 0.05$, test de Tukey).

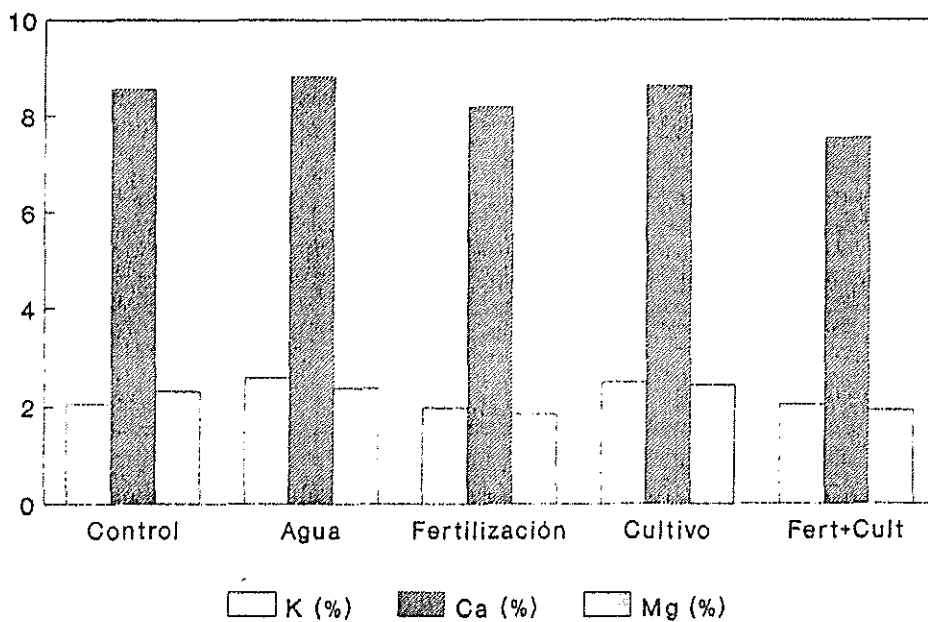
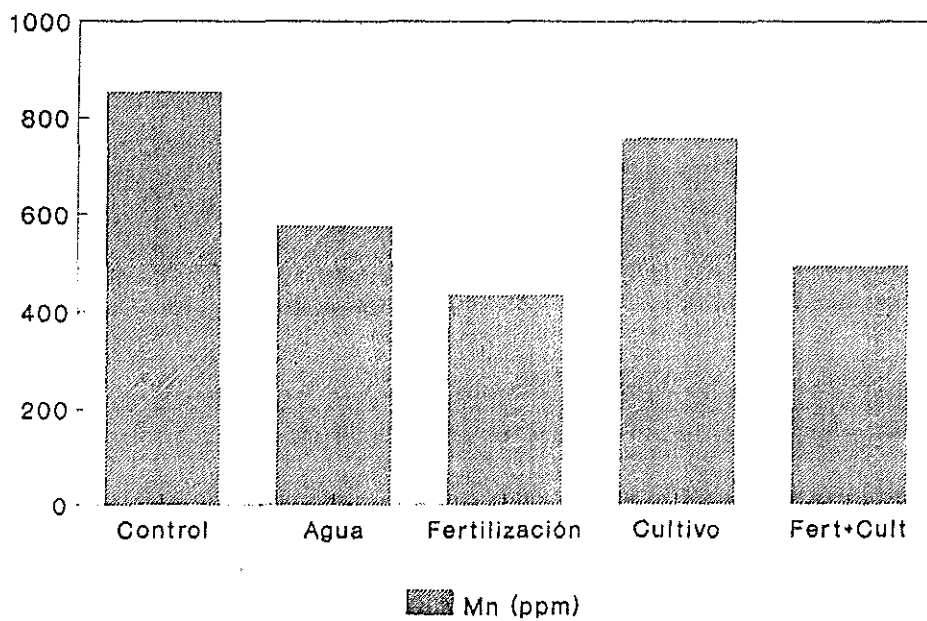
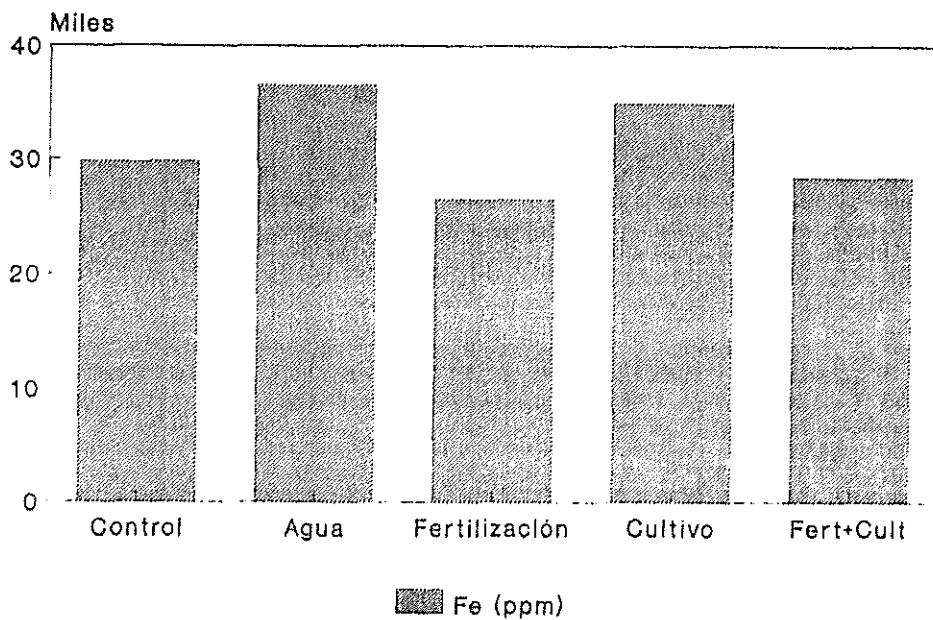


Fig. 8.

Los datos de Conductividad Eléctrica medidos en los sedimentos indican que a lo largo de la experiencia se ha producido una clara disminución de la salinidad, que también se refleja en el descenso en los porcentajes de Na (figura 10).

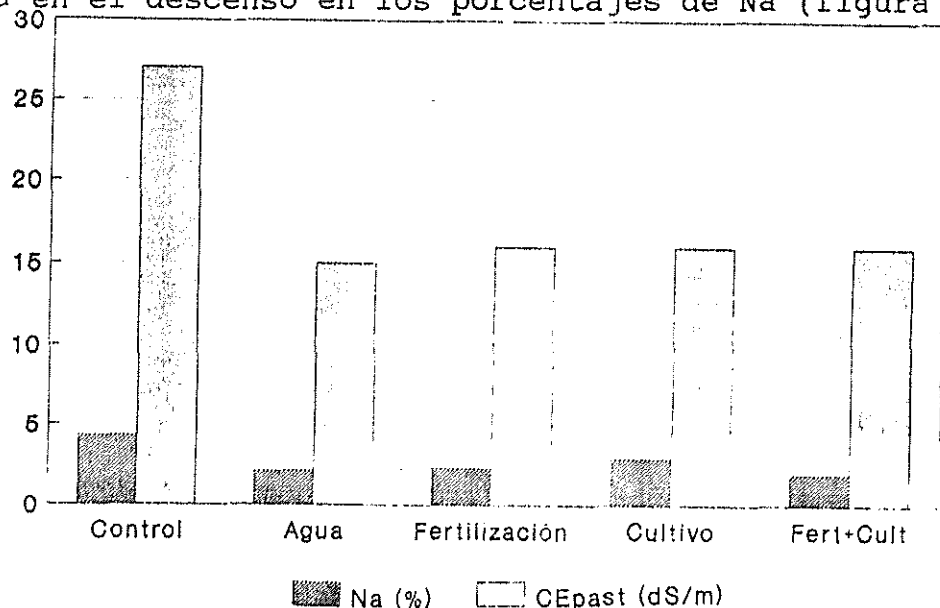


Fig.10.

Es muy destacable el inesperado descenso en materia orgánica total (MOT) que se ha producido en todos los estanques, fertilizados o no. Como puede observarse en la figura 11, este descenso generalizado de aproximadamente el 30% produce un equilibrio entre todos los valores de MOT, que indica en principio una fuerte influencia del continuo lavado producido por la renovación diaria del 10-15% de agua.

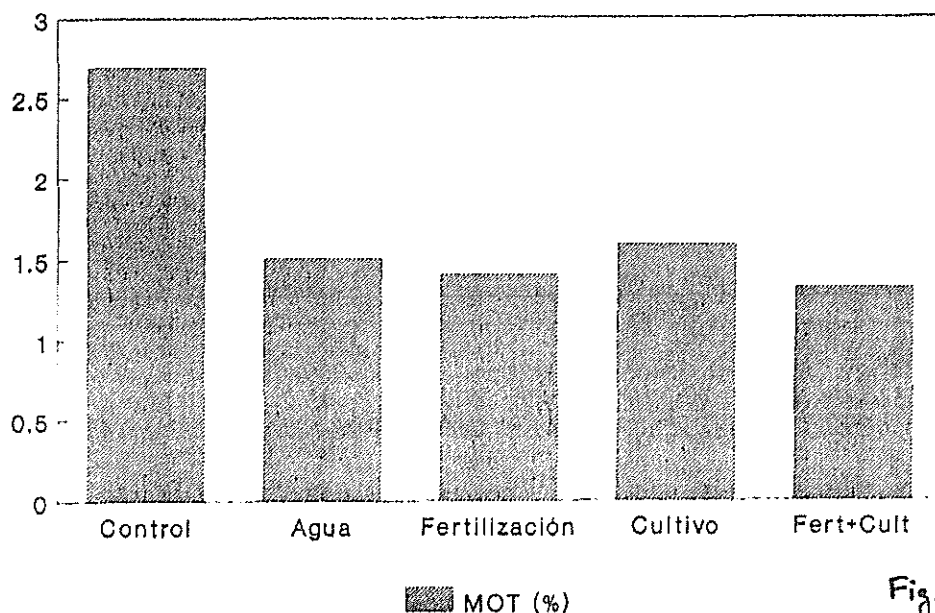


Fig.11.

El descenso en MOT lleva asociado, como era de esperar, disminuciones paralelas en los porcentajes de N y P (Figura 12).

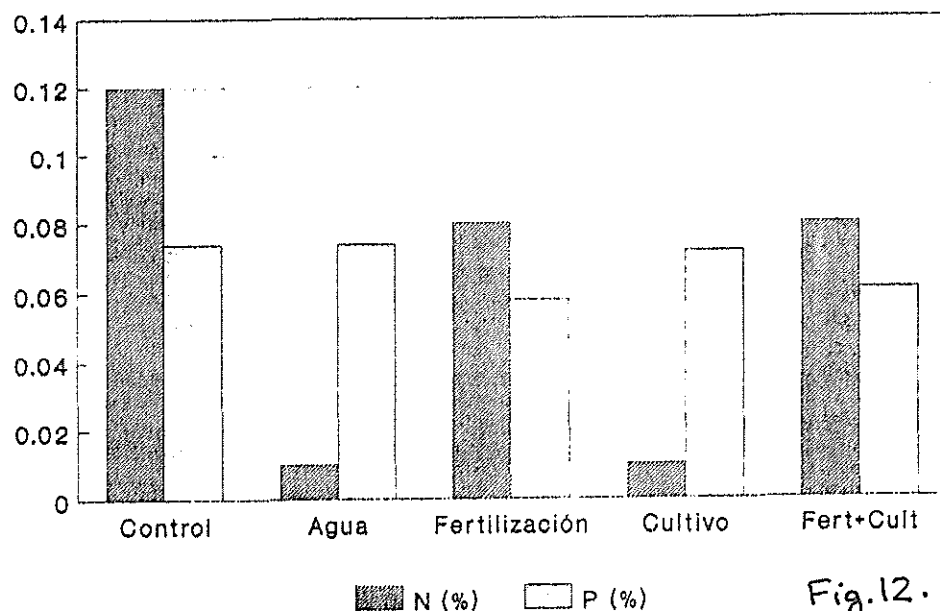


Fig.12.

La disminución de N es mas pronunciada en los estanques no fertilizados (A y Cu) respecto a los que si lo fueron (F y F+Cu), como consecuencia de un leve efecto compensador del fertilizante proteico añadido. En lo que se refiere al contenido de P la tendencia es diferente, ya que apenas se observa variación entre el estanque CONTROL y los estanques no fertilizados (A y Cu), mientras la disminución en los estanques fertilizados (F y F+Cu) es más clara.

Es de resaltar que la disminución en MOT no se refleja en el porcentaje de Extracto Lipídico (EL), que constituye una fracción orgánica cuantitativamente menor, pero de gran significación desde el punto de vista biogeoquímico y medioambiental.

El valor de EL aumenta con respecto al estanque CONTROL en todos los casos, observándose un aumento considerable en el caso de los estanques fertilizados y cultivados (F+Cu), como puede verse más gráficamente en los histogramas de la figura 13.

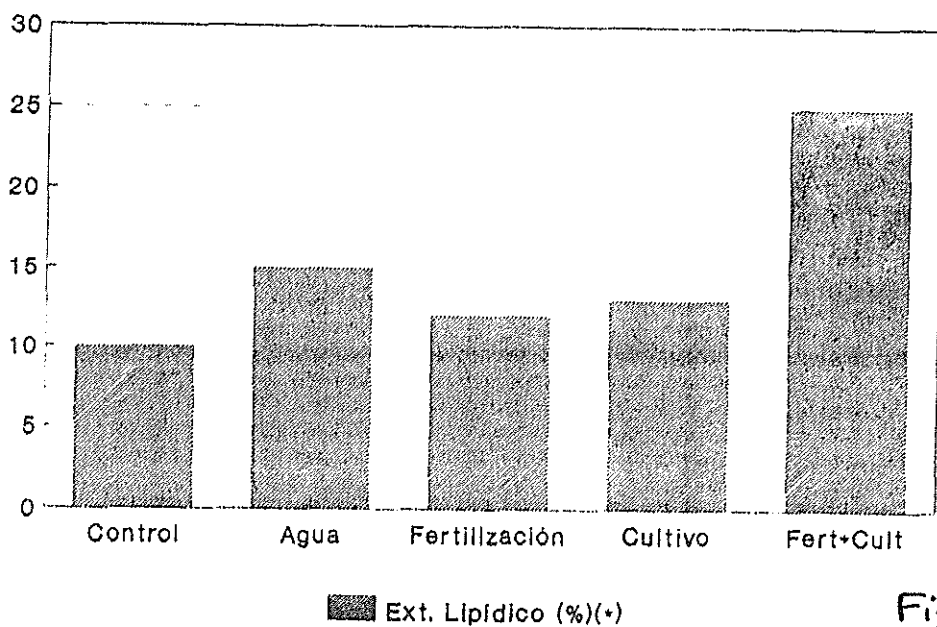


Fig. 13.

Este aumento se debe indudablemente a la contribución de materiales alóctonos (el fertilizante añadido, y materia orgánica de origen terrestre, en particular), y al aumento de contribuciones autóctonas, dominadas por material algal y microbiano.

Respecto a la distribución del extracto lipídico en fracciones neutras y ácidas, se ha observado en todos los estanques una preponderancia de las fracciones neutras respecto de las ácidas, excepto en el caso de los estanques solamente fertilizados (F), en los que ambas fracciones se igualan (figura 14).

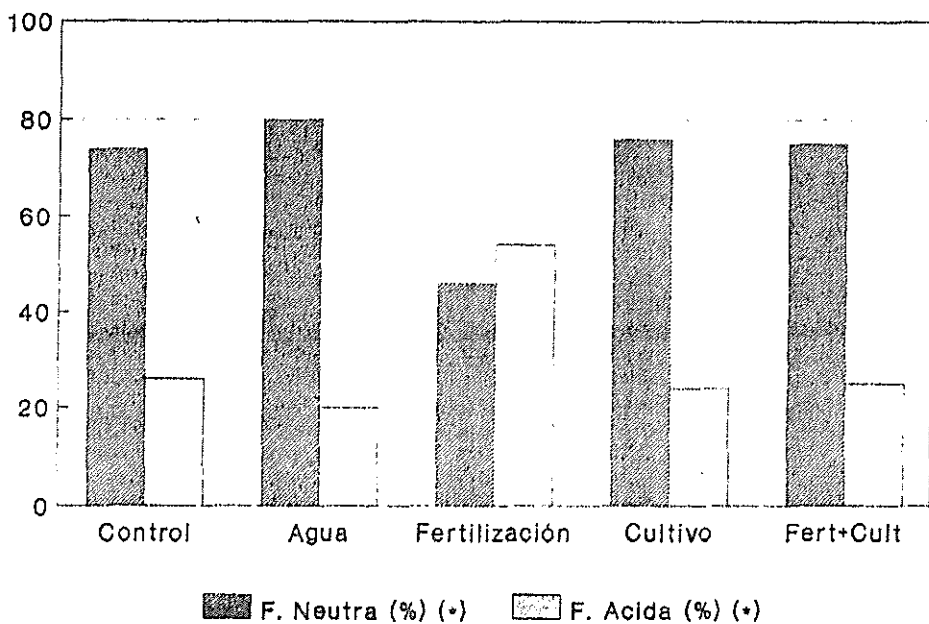


Fig. 14.

II .3.2 Composición mineralógica

En la Figura 15 se muestran los análisis de la composición mineralógica, por difracción de rayos X, de las muestras de sedimentos superficiales de uno de los estanques (R1), antes y después de la experiencia. Los resultados son representativos de los obtenidos al analizar todos los estanques, y, como era de esperar, no se observan diferencias cualitativas en los distintos sedimentos analizados. Los minerales identificados en todos los casos en orden decreciente de contenidos fueron Cuarzo, Calcita, Halita, Dolomita, Ilita, Albita, y Kaolinita.

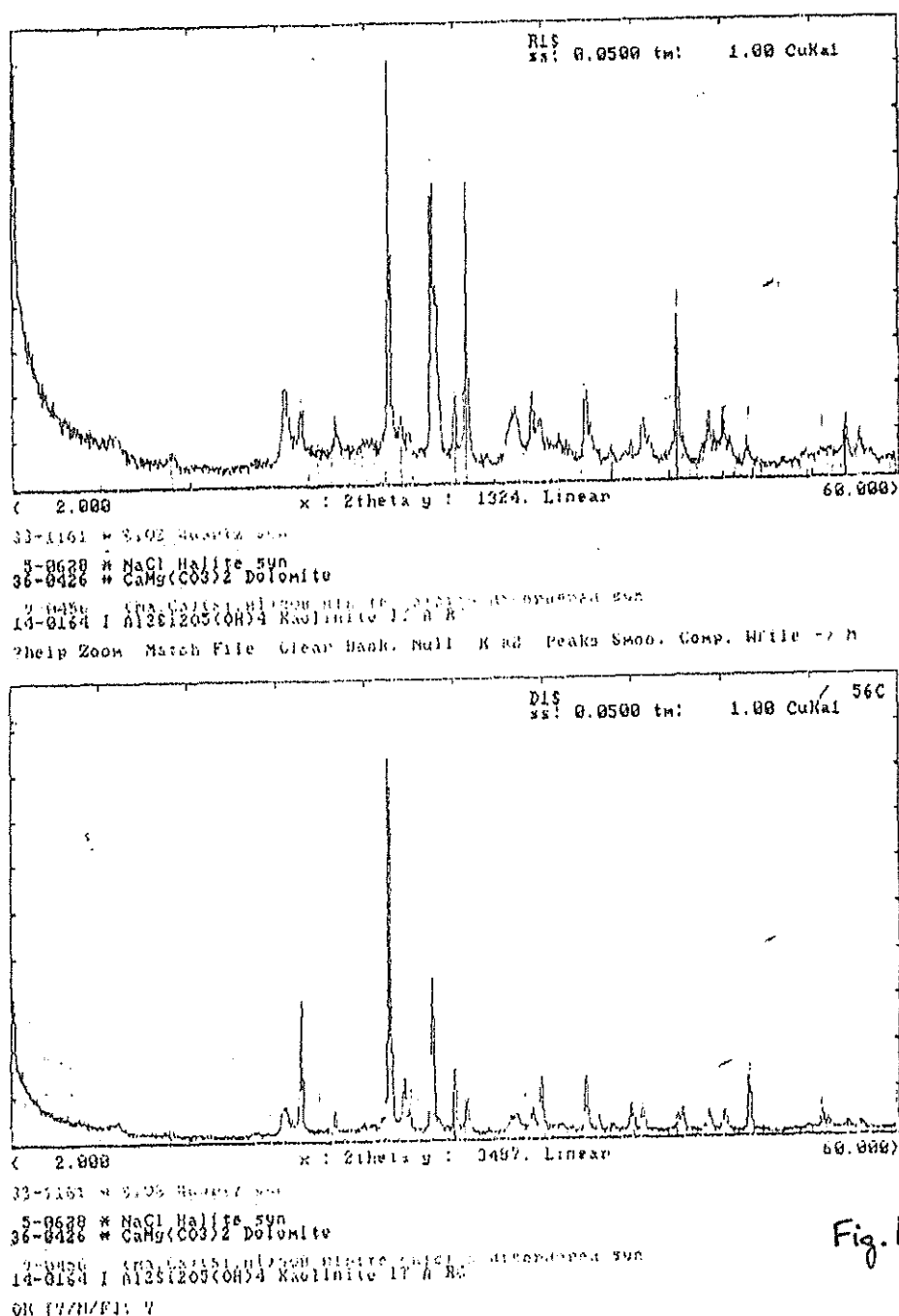


Fig. 15.

II .3.3 Composiciones lipídicas

El aumento cuantitativo relativo que experimenta la fracción lipídica de los sedimentos después de los diferentes tratamientos, debe investigarse en profundidad, ya que se trata de una fracción especialmente activa en los diversos procesos bioquímicos y geoquímicos en los que participa la materia orgánica (MO) sedimentaria.

Baste recordar que los animales bénticos y los microorganismos dependen de la MO para su nutrición. Por otra parte, dado que muchos componentes lipídicos son fácilmente oxidables, la concentración de oxígeno disuelto en el agua puede depender de la presencia o no de tales componentes en la interfase agua/sedimento. Además, son muy comunes en los sedimentos las reacciones redox por las que especies inorgánicas oxidadas son reducidas por interacción con la MO. Por último, el estudio de las fracciones lipídicas puede suministrar una información valiosa sobre la eventual incidencia de un input ambiental concreto.

En el caso que nos ocupa, el único factor controlable que ha podido influir en la alteración de la fracción lipídica es el fertilizante añadido (MOT= 85,2 %; Proteínas= 44 %), que contiene un porcentaje relativamente elevado (5,32 %) de material lipídico. La naturaleza química de este material se muestra en los TICs de las fracciones neutra y ácida, que se presentan en la figura 18. Se observa claramente en los mismos que la fracción neutra está dominada por el pico correspondiente al colesterol, mientras que la ácida lo está por los ácidos grasos saturados C_{16} y C_{18} y por los insaturados $C_{18:1}$ y $C_{18:2}$.

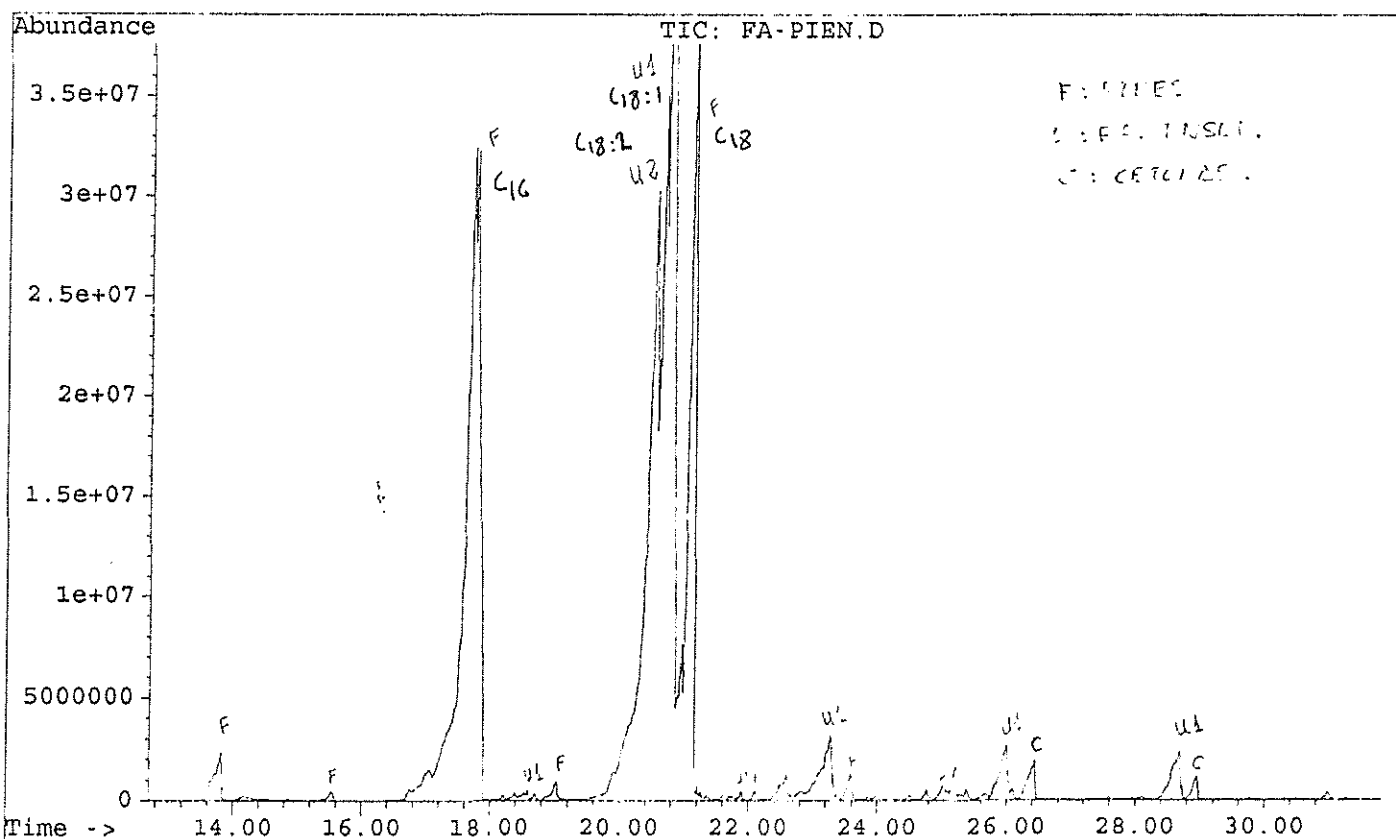
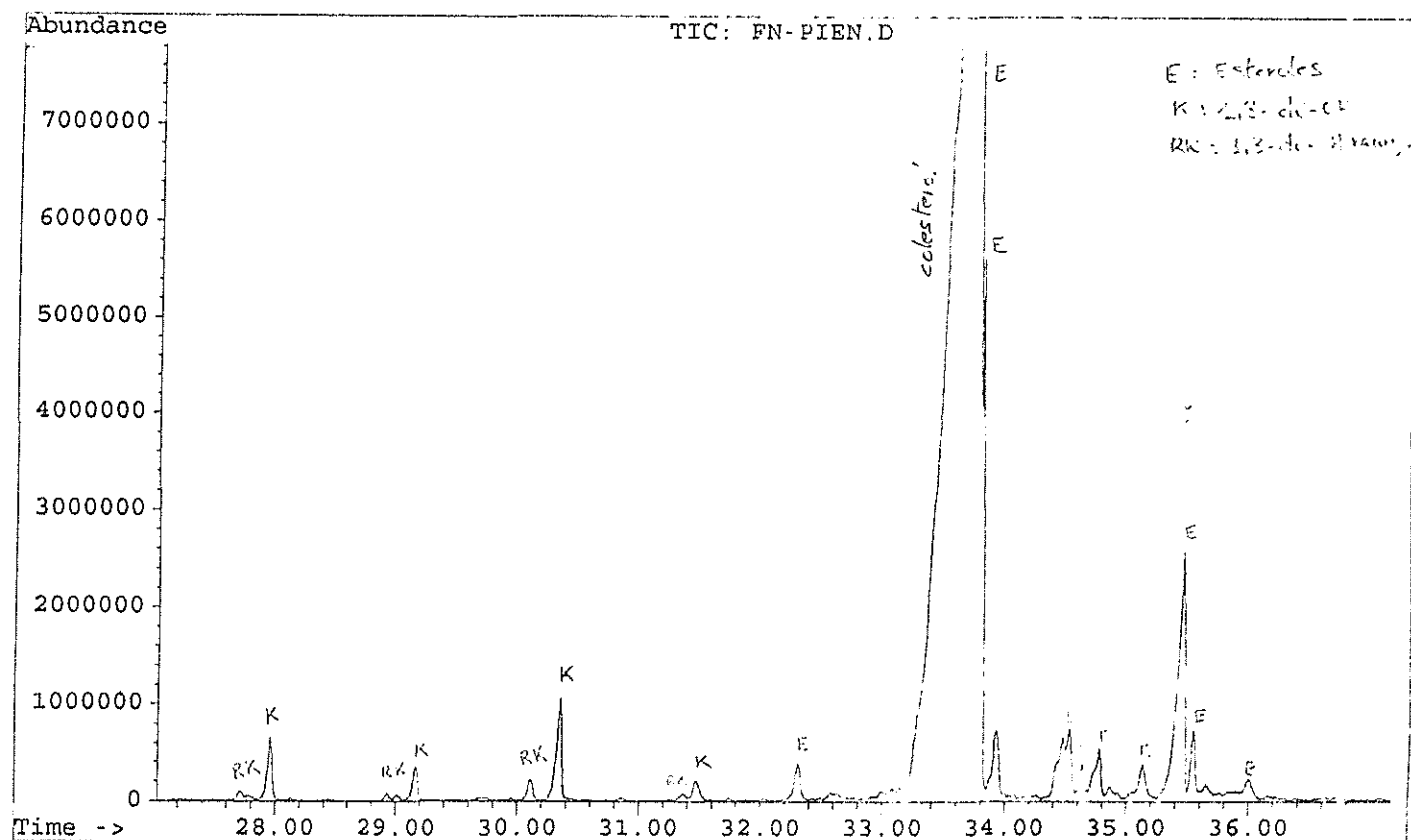


Figura 18. Cromatogramas de Ión Total de la fracción neutra (a) y de la fracción ácida (b) del fertilizante utilizado.

En las figuras 19-22 y 23-26 se presentan Cromatogramas de Ion Total (TIC) correspondientes a las fracciones neutras y ácidas de muestras de sedimentos representativas de los distintos tratamientos, comparados con el del estanque CONTROL. En la tabla IX se recoge la naturaleza química de las principales series de compuestos detectados en las diferentes muestras.

Tabla IX. Composición de las muestras de sedimentos en los distintos tratamientos.

	CONTROL	AGUA	PIENSO	CULTIVO	PIEN+CULT
n-ALCANOS	C17-C38	C17-C34	C16-C36	C14-C31	C14-C33
n-ALCOHOLES	C14-C32	C12-C27	C14-C26	C12-C38	C14-C32
n-FAMES	C14-C30	C12-C38	C14-C30	C12-C28	C14-C32
FAMES INSATURADOS	C16,C17, C18	C16,C17, C18	C15,C17	C16,C17, C18	C16,C17,C 18
FAMES RAMIFICADOS	C15,C17	C15,C17	C15,C16, C17	C15,C16, C17	C15
Ó-HIDROXIACIDOS	C22,C23	C22,C23	C22,C23	C22,C23	C22
FITOL	**	****	****	****	**
DIHIDROFITOL	*	---	---	---	***
ESTEROLES (*)	a,b,c,d, e,f,g,h, i,j,k,l, m	b,c,d,g, h,i,k,l	b,c,d,e, f,g,h,i, j,k,l,m	a,b,c,d, e,f,g,h, i,k,l	c,d,e,g,h ,i,k,l
9,10-DIOLES	C16,C18	C16,C18	C18	C16,C18	C16,C18
OTROS (**)	DOPG, 30- Hopanol, Hopanos	DOPG	DOPG	Hopanos	---

(*) Ver Tabla X.

(**) DOPG: di-o-fitanil-glicerol.

En esta tabla se indica que las diferencias cualitativas entre las composiciones de las muestras control y los tratamientos son poco relevantes. Sin embargo, las distribuciones de las principales series de compuestos y las abundancias

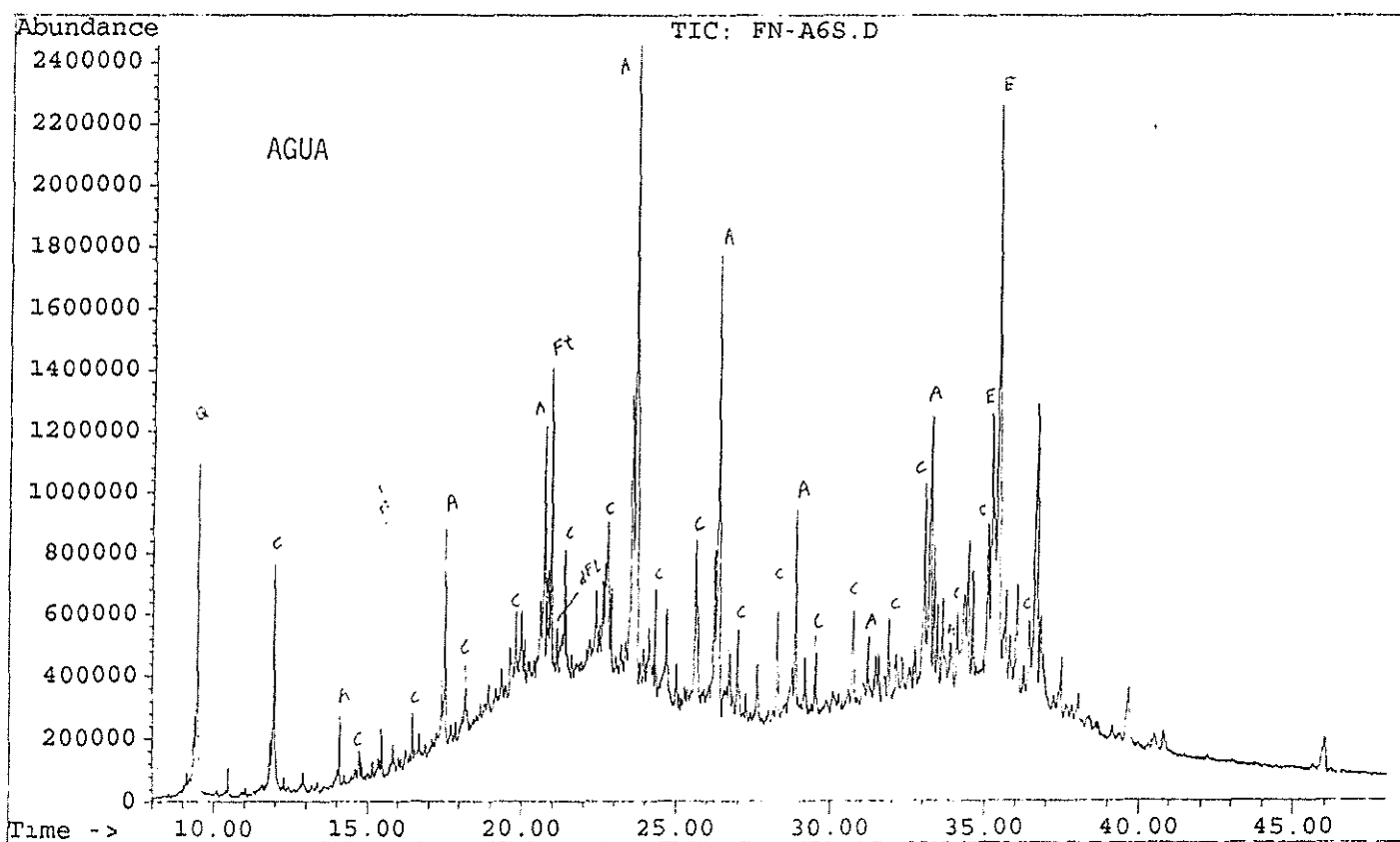
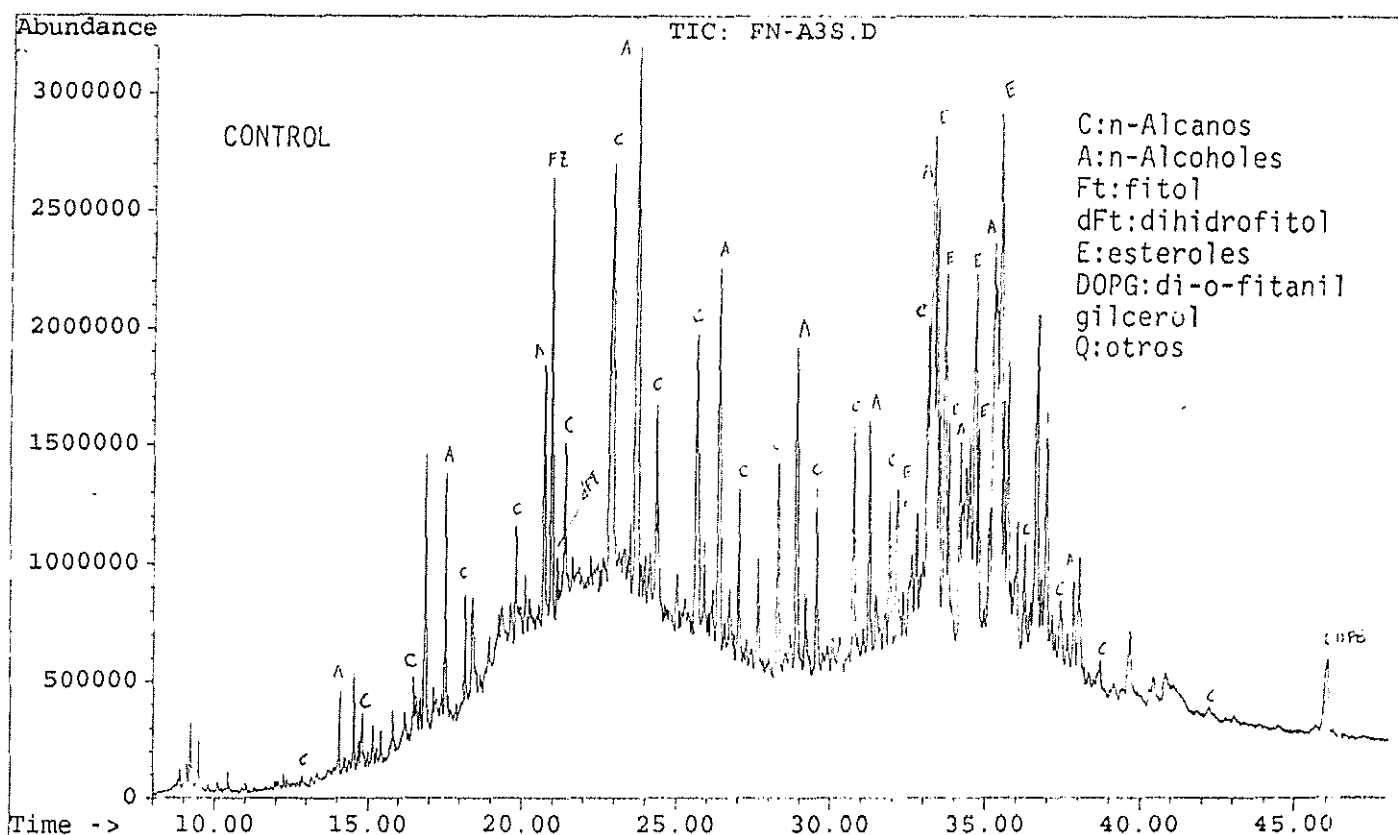


Figura 19. Cromatogramas de Ión Total de las fracciones neutras, de la muestra CONTROL (a) y de la muestra representativa de los estanques con tratamiento de agua (b).

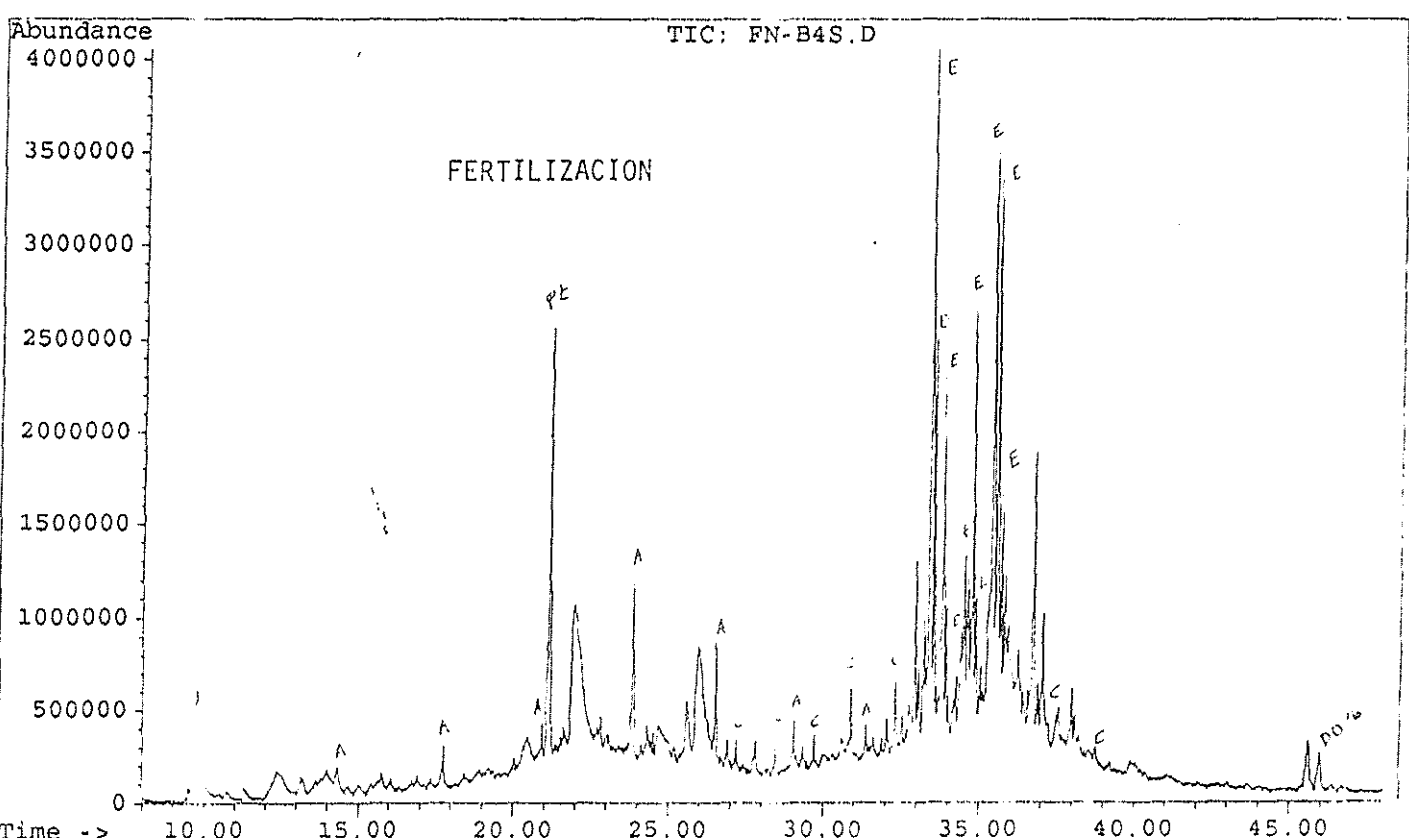
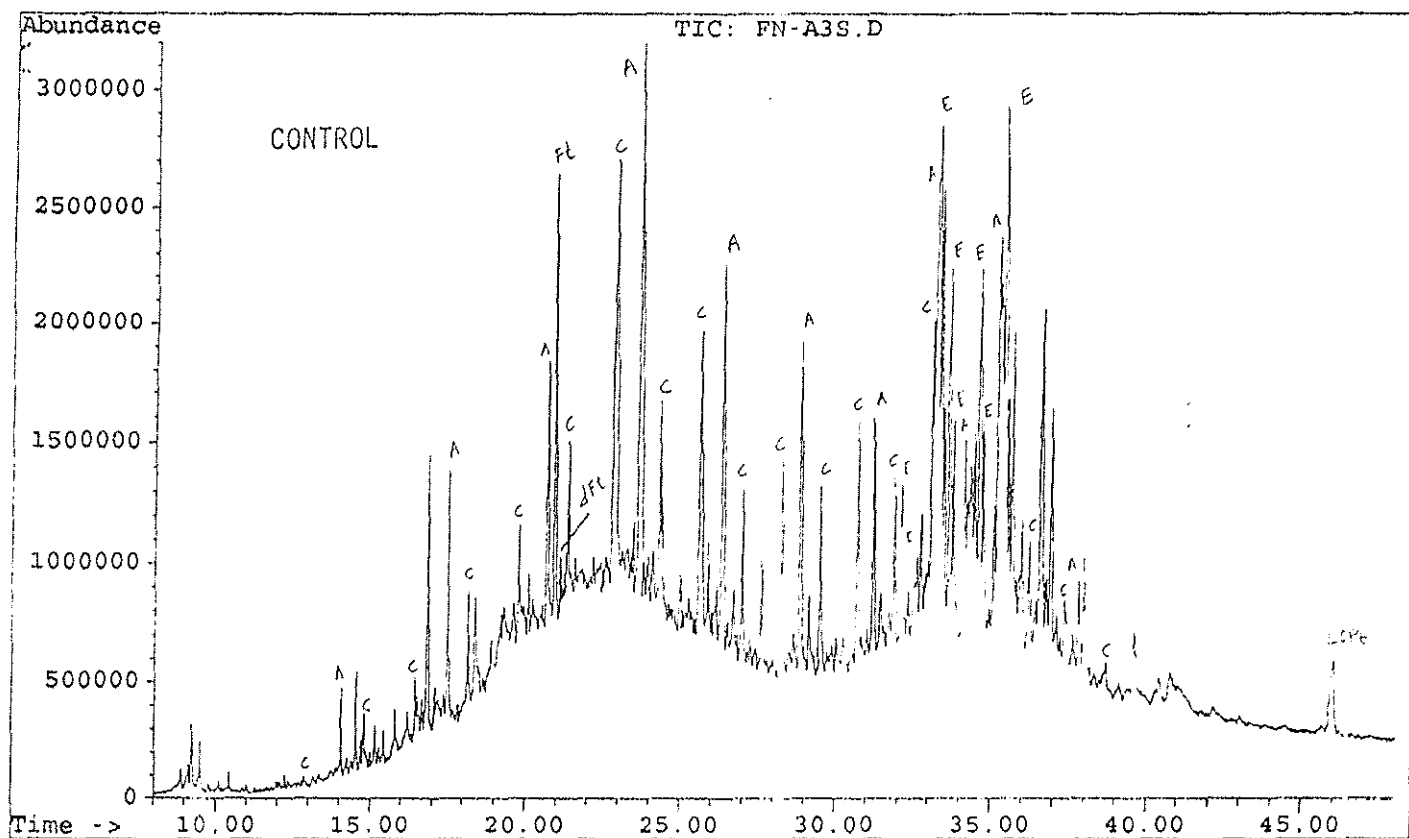


Figura 20. Cromatogramas de Ión Total de las fracciones neutras, de la muestra CONTROL (a) y de la muestra representativa de los estanques solamente fertilizados (b).

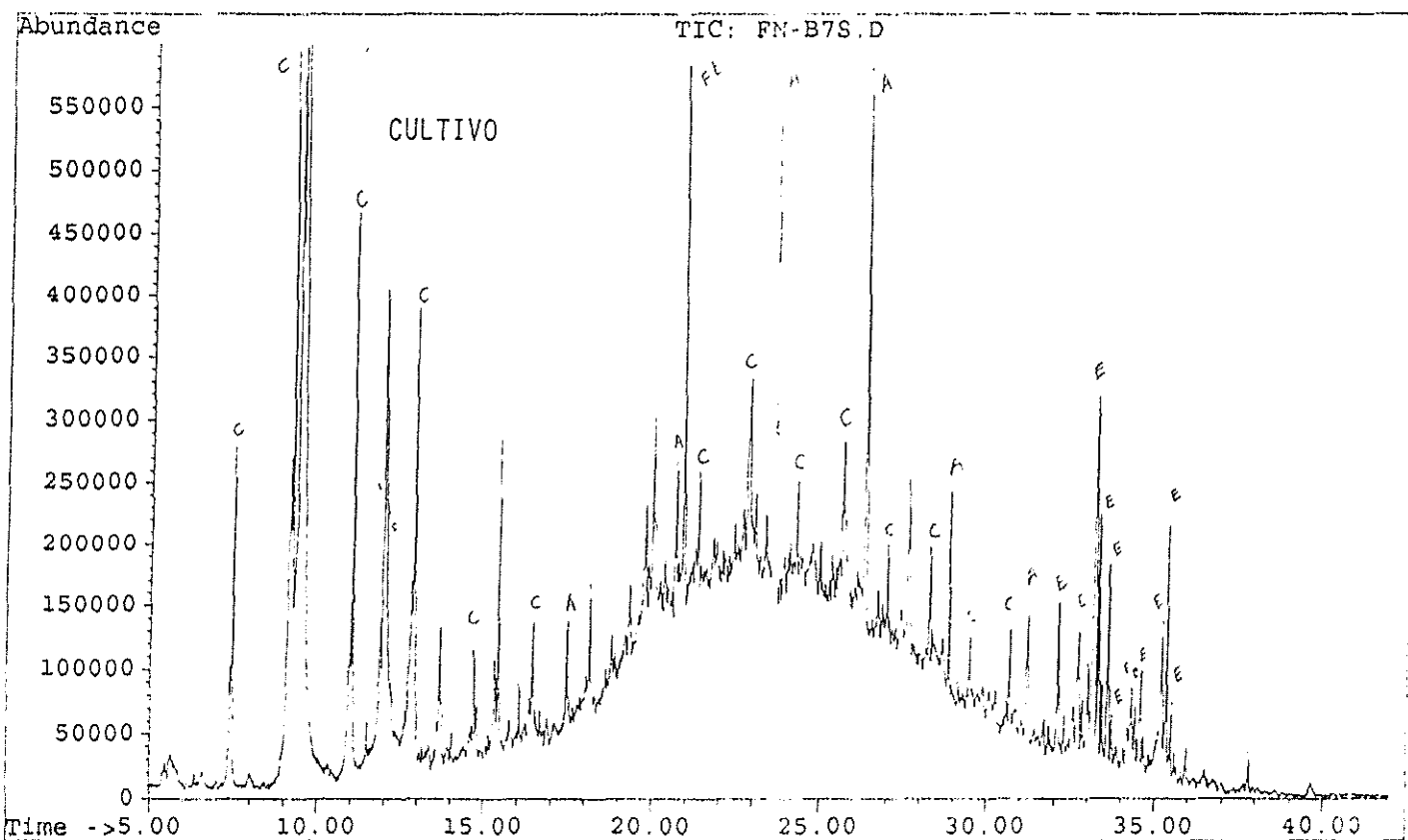
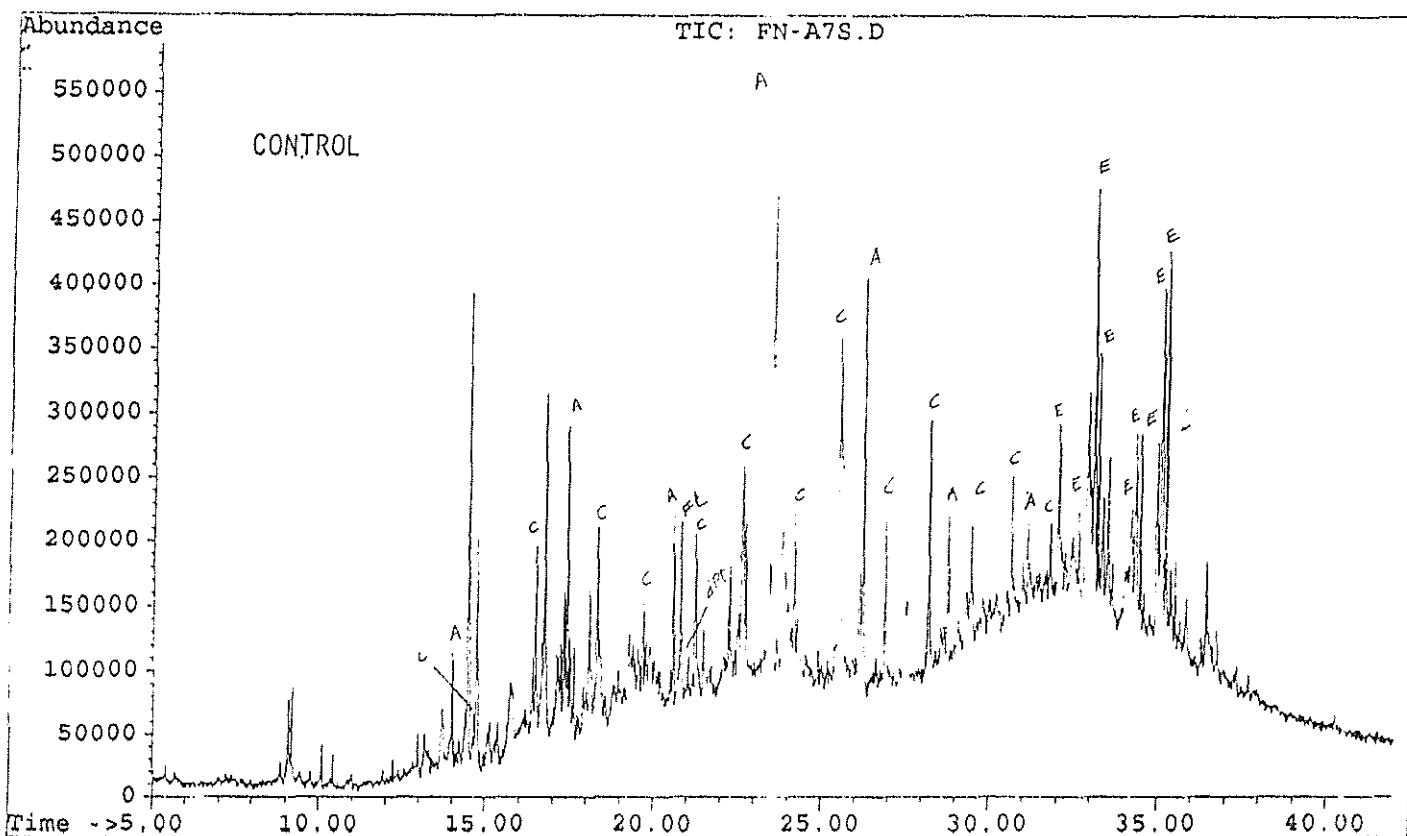


Figura 21. Cromatogramas de Ión Total de las fracciones neutras, de la muestra CONTROL (a) y de la muestra representativa de los estanques solamente cultivados (b).

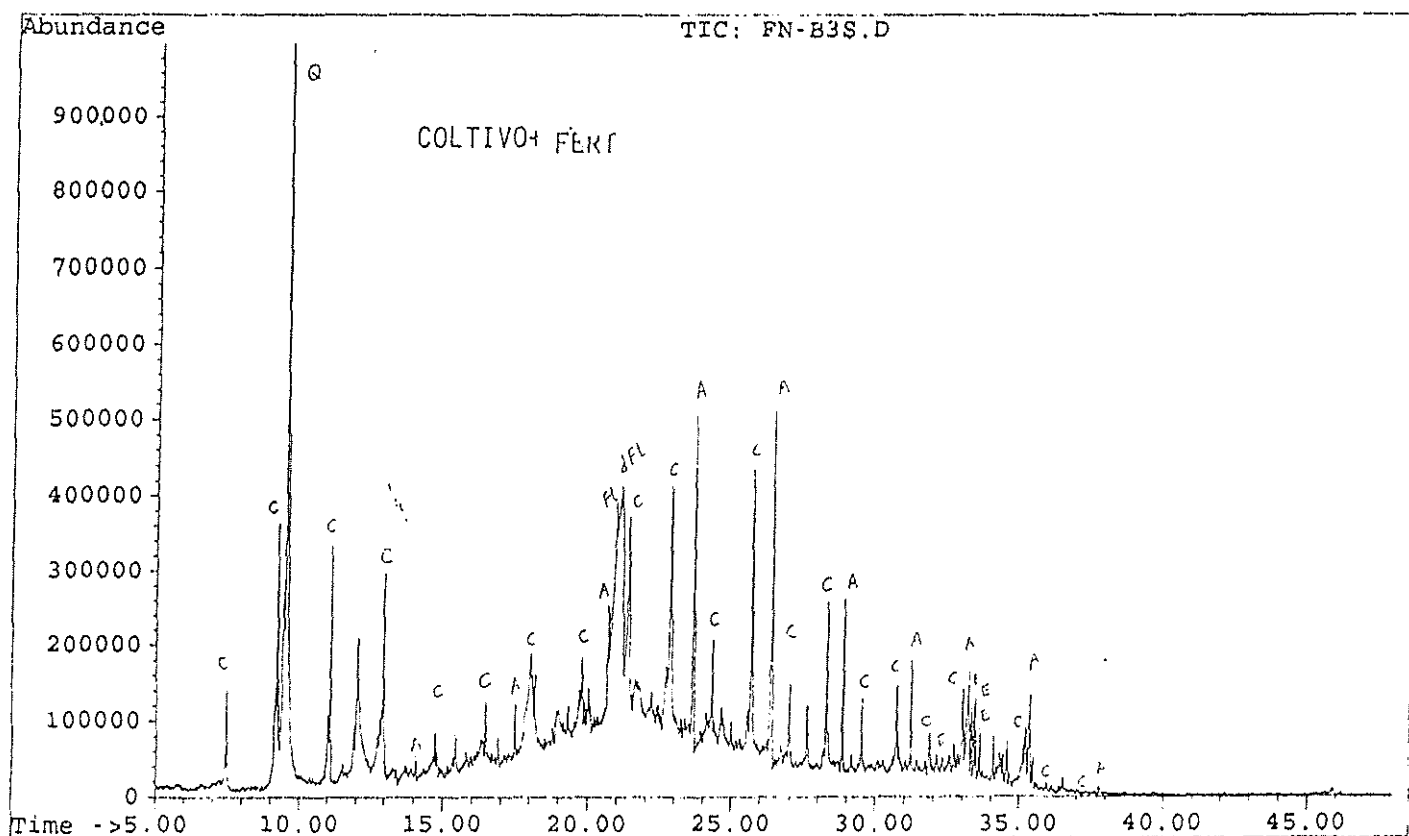
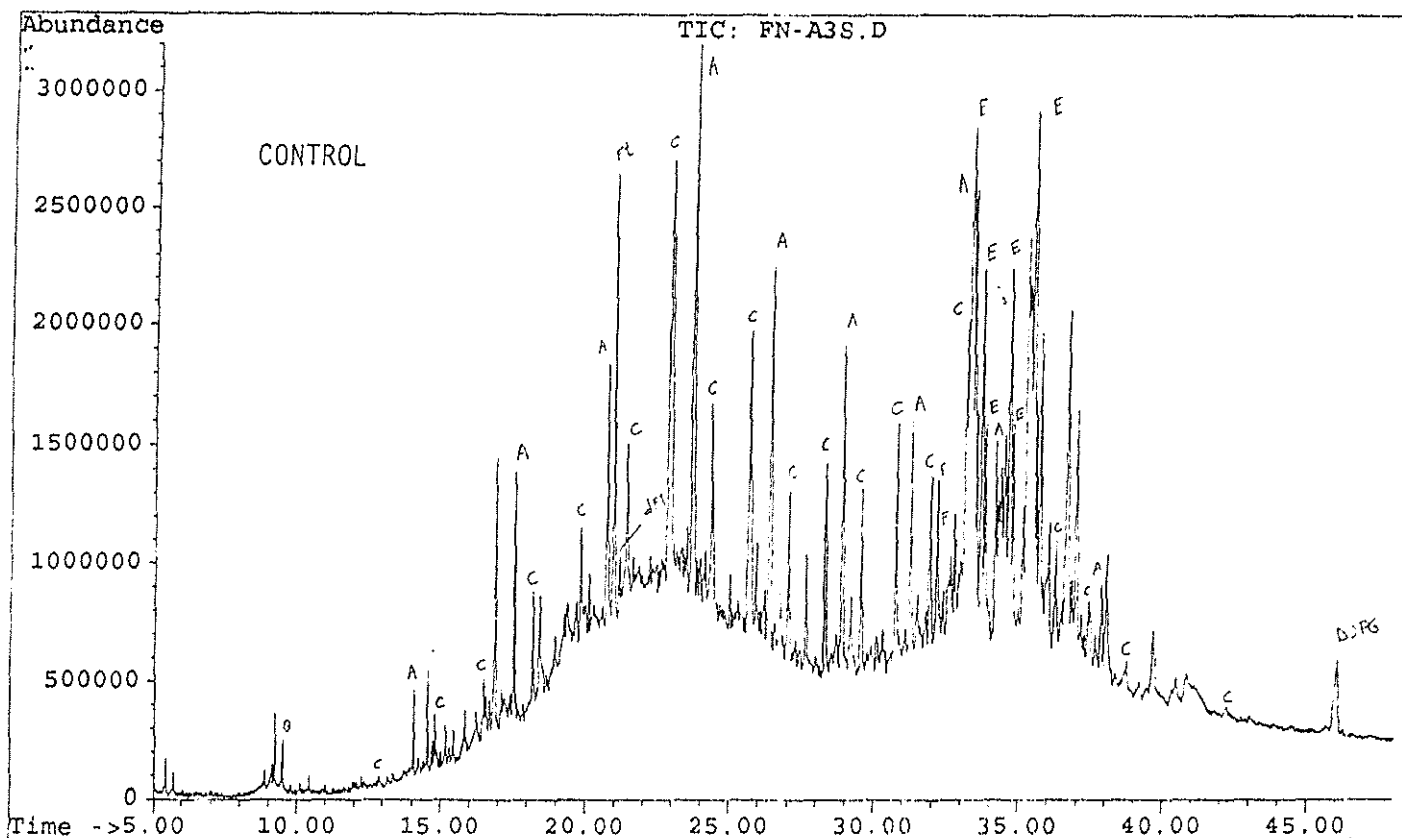


Figura 22. Cromatogramas de Ión Total de las fracciones neutras, de la muestra CONTROL (a) y de la muestra representativa de los estanques fertilizados y cultivados (b).

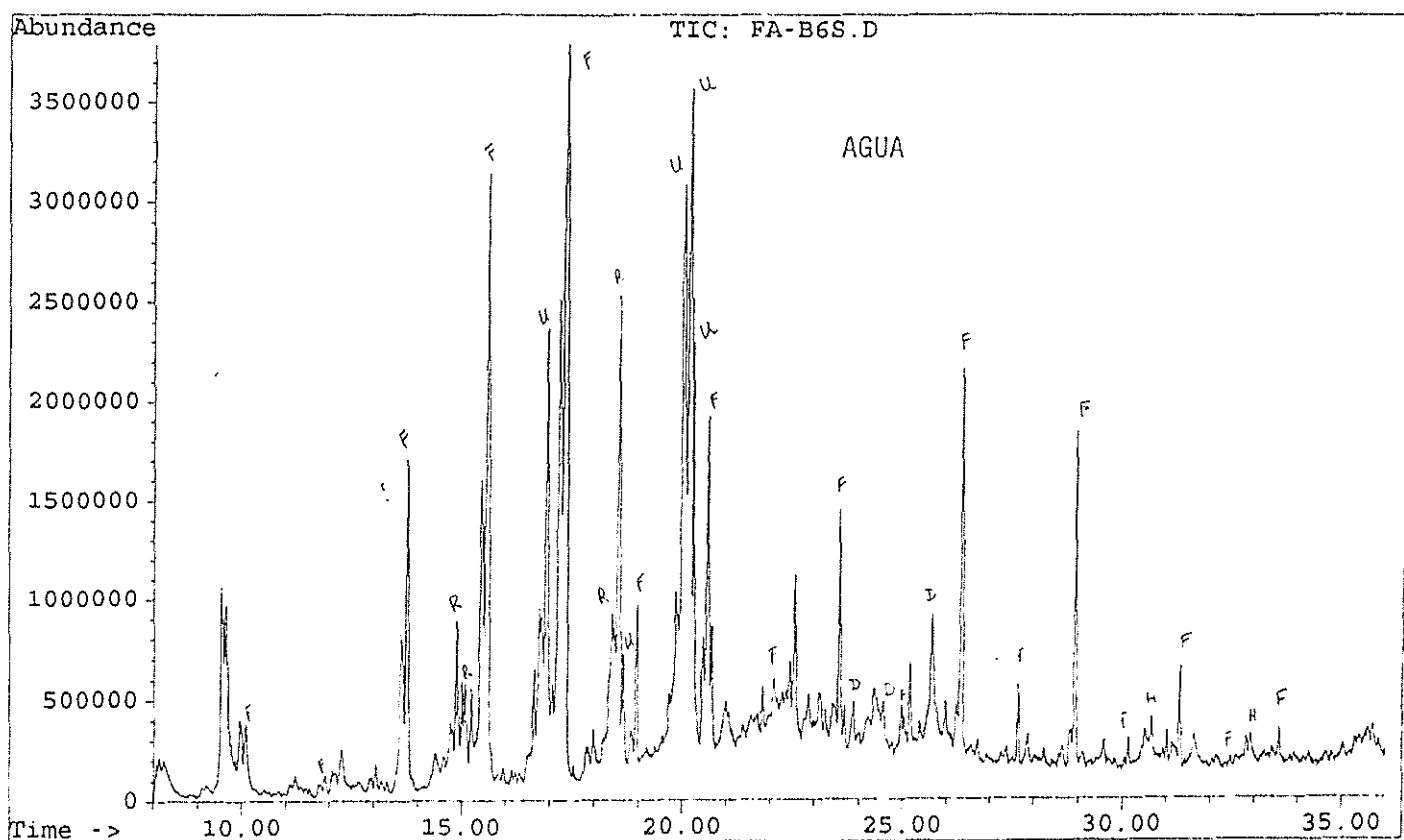
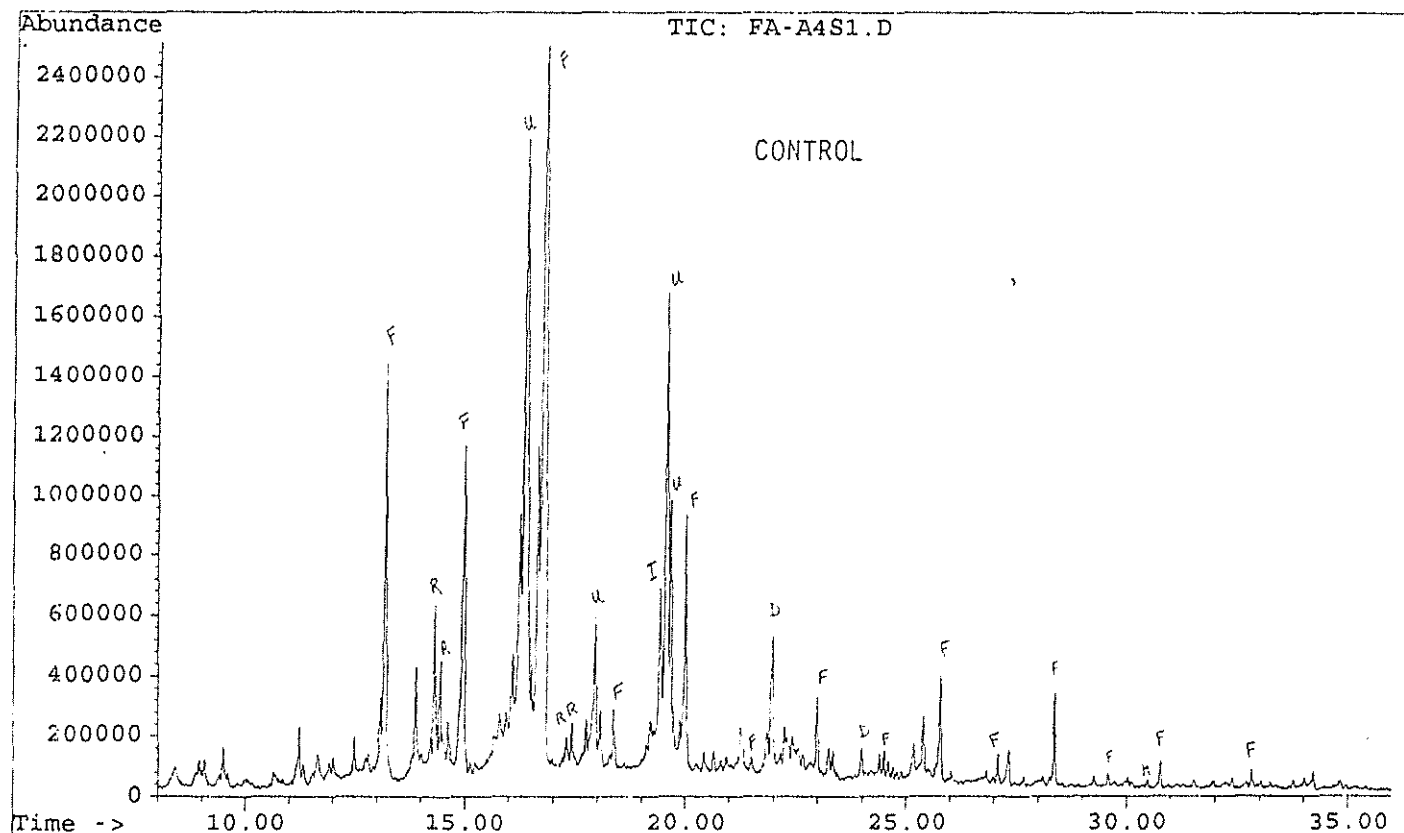


Figura 23. Cromatogramas de Ión Total de las fracciones ácidas de la muestra CONTROL (a) y de la muestra representativa de los estanques con tratamiento de agua (b).

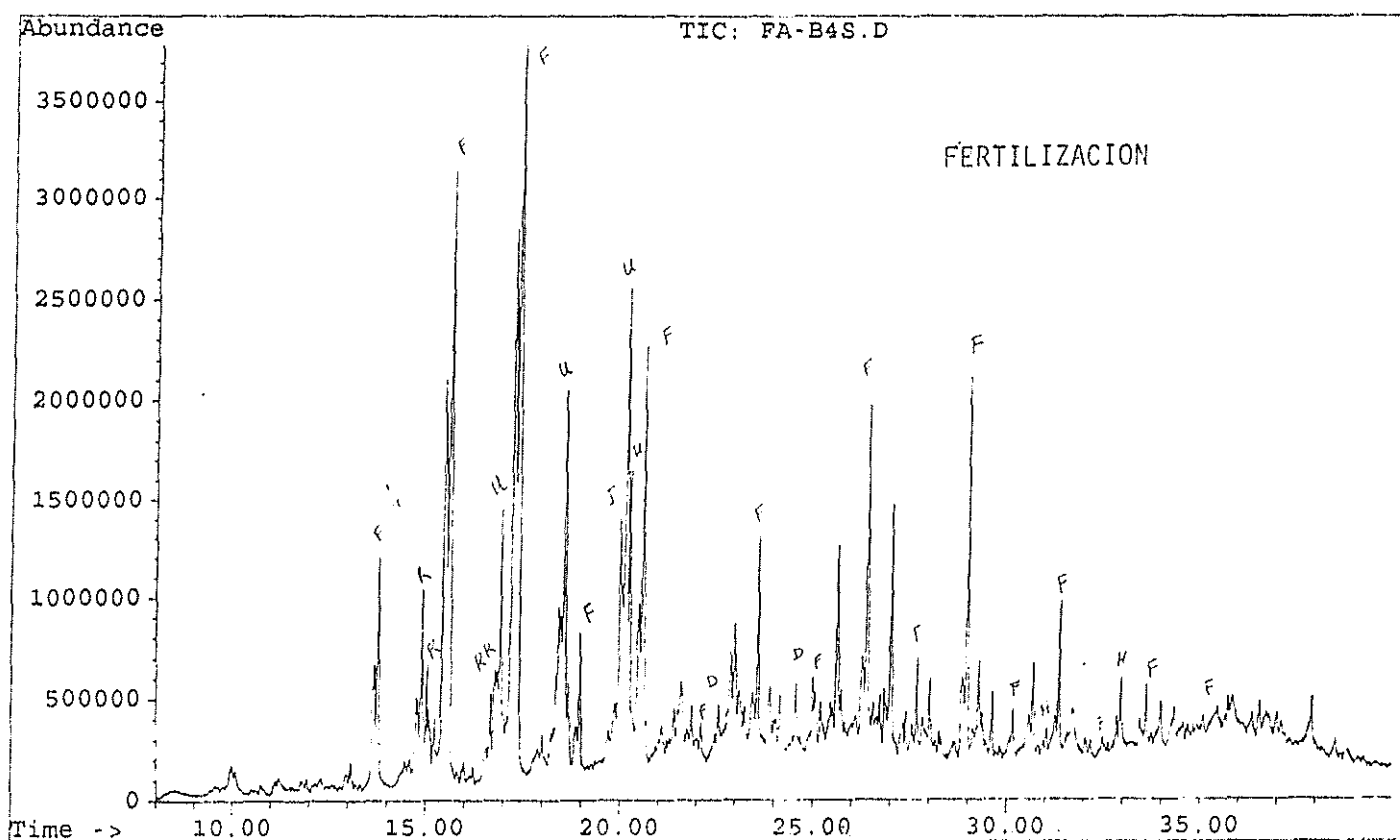
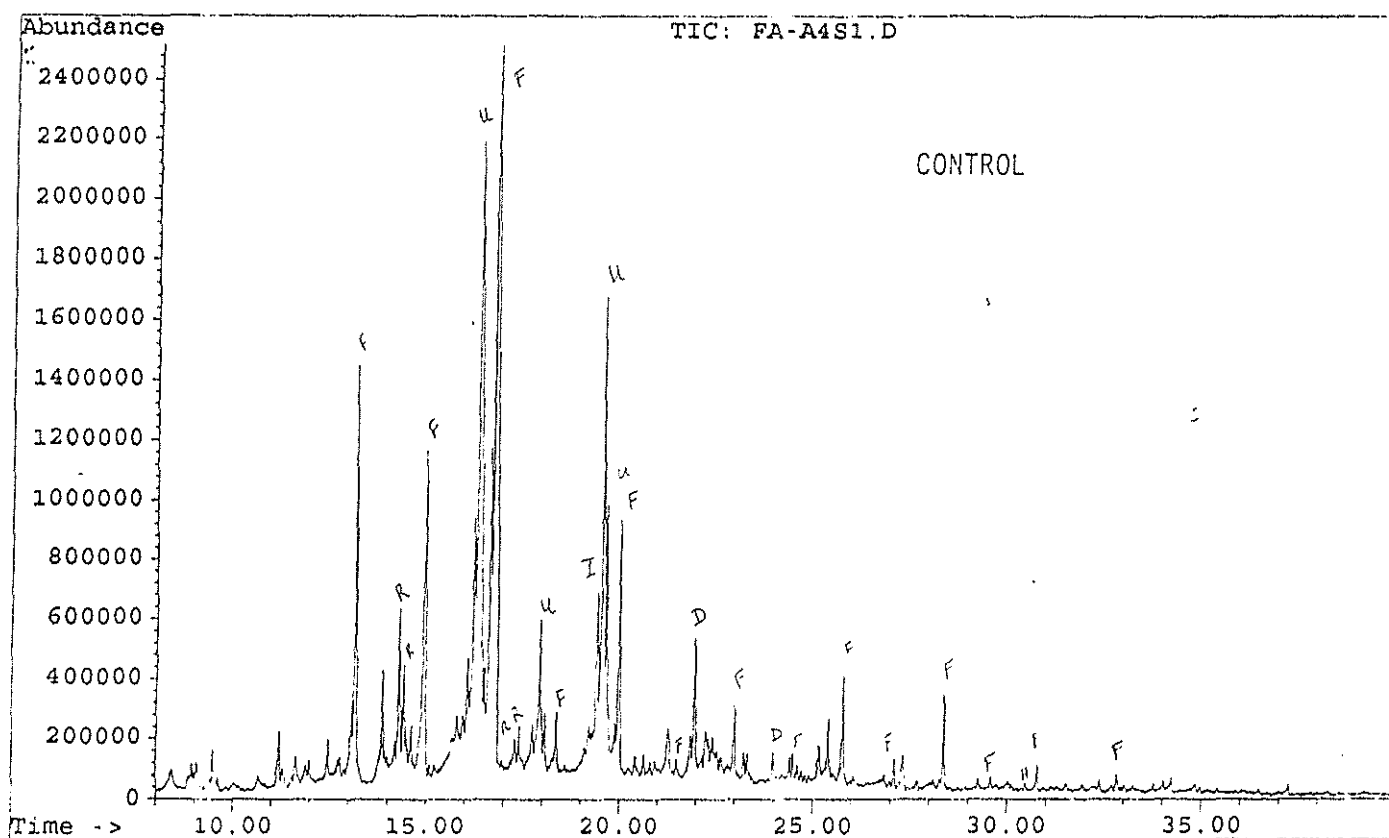


Figura 24. Cromatogramas de Ión Total de las fracciones ácidas de la muestra CONTROL (a) y de la muestra representativa de los estanques solamente fertilizados (b).

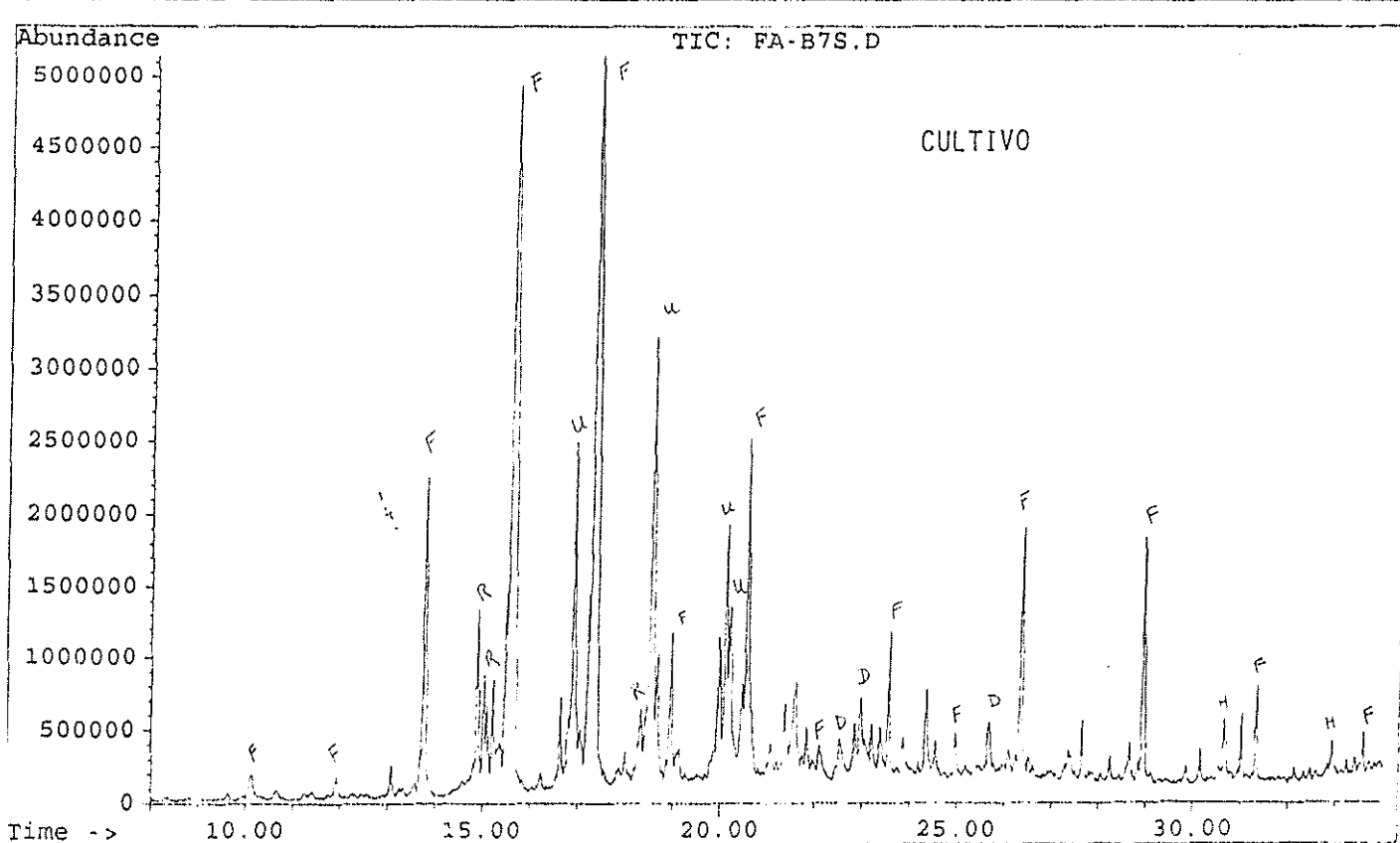
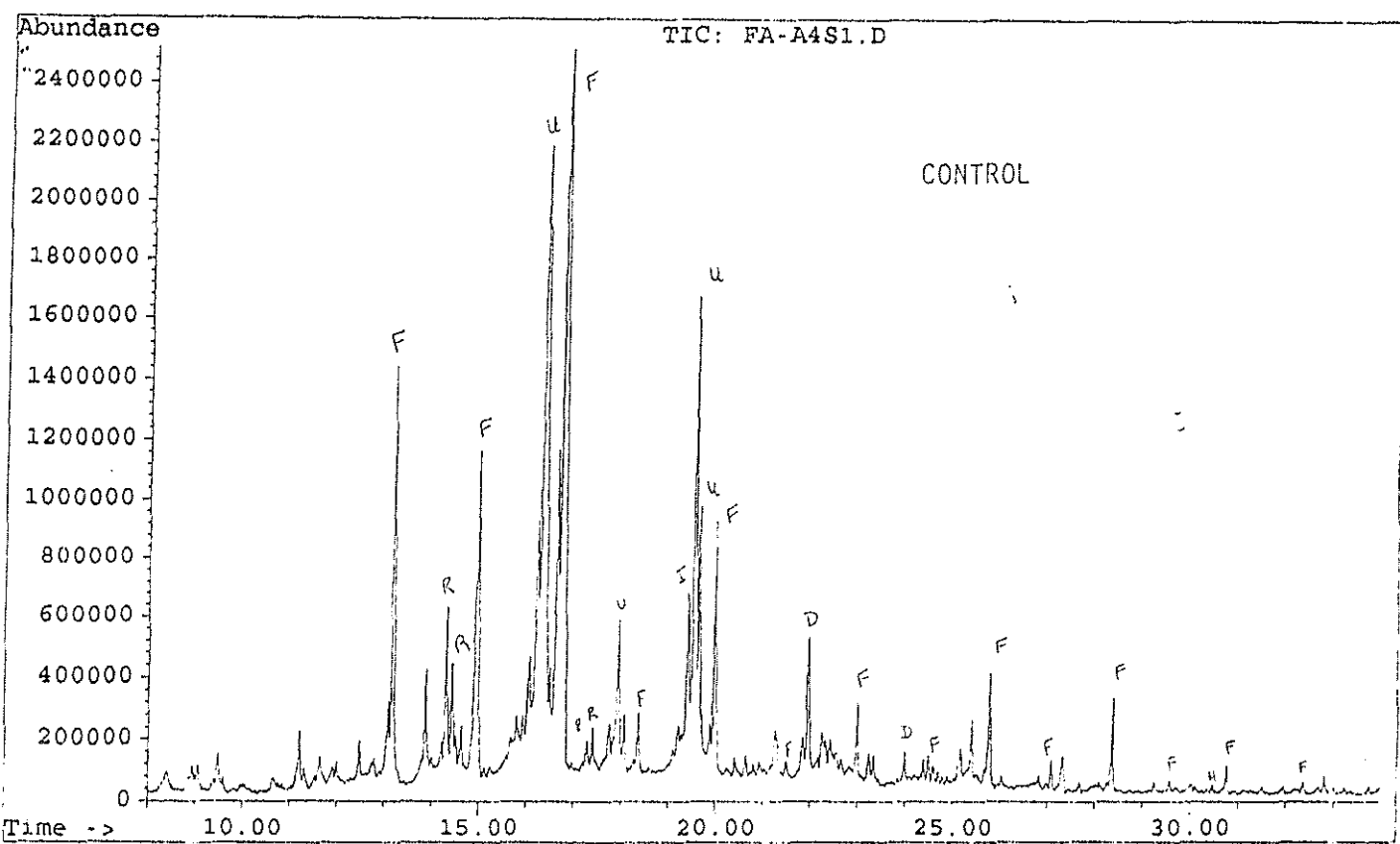


Figura 25. Cromatogramas de Ión Total de las fracciones ácidas de la muestra CONTROL (a) y de la muestra representativa de los estanques biológicamente cultivados (b).

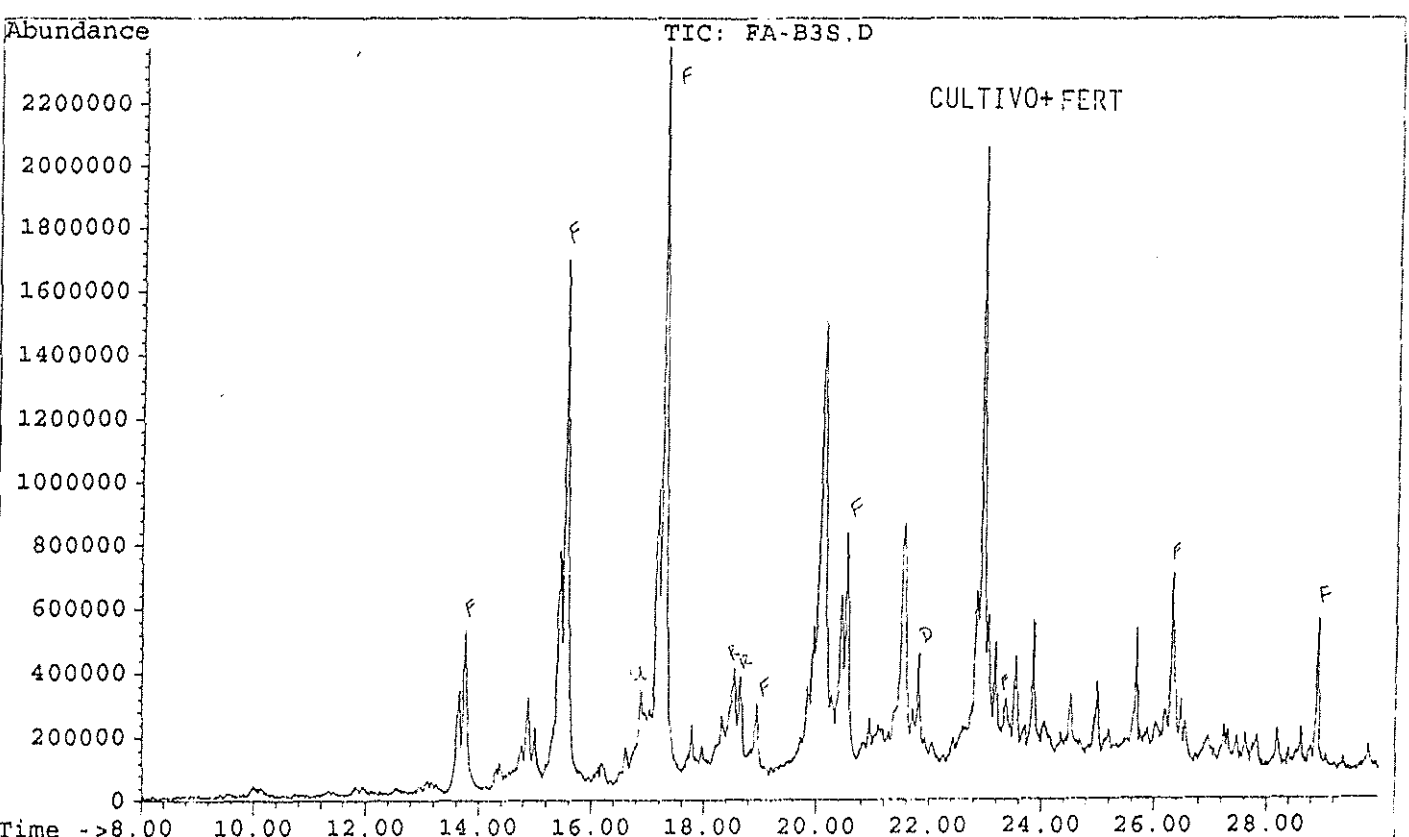
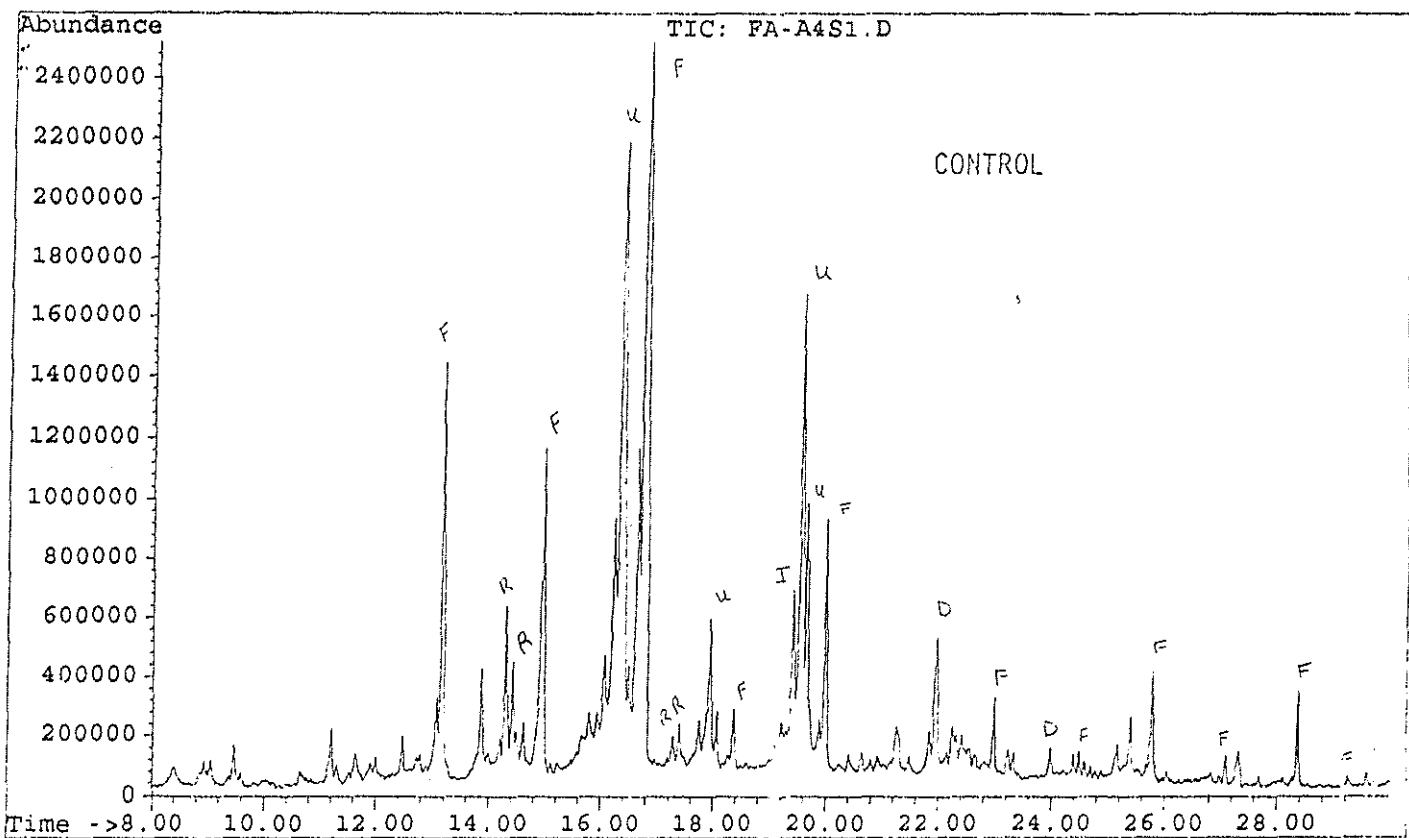


Figura 26. Cromatogramas de Ión Total de las fracciones ácidas de la muestra CONTROL (a) y de la muestra representativa de los estanques fertilizados y cultivados (b).

relativas de los principales homólogos presentan notables diferencias, que se observan a simple vista en los TICs que se presentan.

Las citadas diferencias son más acusadas en las fracciones neutras que en las ácidas, y algunas son particularmente destacables. Es evidente, por ejemplo, la desaparición de la distribución bimodal de los n-alcanos en los sedimentos de los estanques fertilizados (Figuras 20 y 22). Asimismo, llama la atención el enriquecimiento en n-alcanos de bajo peso molecular de los sedimentos procedentes de estanques en los que hubo cultivo (Figuras 21 y 22). En cuanto a las fracciones ácidas, las diferencias más notables se aprecian al comparar el sedimento control con los que han recibido fertilización y cultivo (Figura 26).

Estas y otras tendencias serán discutidas a la luz de los datos medioambientales medidos en la columna de agua, y a los datos sobre alteraciones del microbentos. Para ello se seleccionarán los compuestos de más interés como "marcadores biológicos", y se compararán las distribuciones que presenten en los diferentes sedimentos.

Como ejemplo representativo se presenta a continuación la alteración que ha experimentado la fracción de esteroides identificados en los sedimentos. El estudio de la composición de esteroides ha sido considerado por numerosos autores, como un método válido para evaluar la actividad bacteriana y el grado de intervención de inputs específicos, y, en suma, para apreciar la intensidad de los procesos biogeoquímicos que ocurren en la interfase agua/sedimento de sedimentos recientes.

En las figuras 27 y 28 se presentan las trazas de compuestos esteroideos presentes en los diferentes sedimentos, obtenida mediante monitorización de iones de diagnóstico de los correspondientes trimetrilsilil ésteres. Las letras sobre los picos corresponden a los compuestos individuales que se detallan en la tabla X.

Como es frecuente en sedimentos de muy diverso origen, los componentes individuales dominantes son colesterol (c) y dos esteroides C₂₉, β -sitostanol (l) y β -sitosterol (k). El colesterol no puede utilizarse como marcador biológico específico, porque se encuentra en las membranas celulares de casi todos los organismos, pero en nuestro caso su variabilidad cuantitativa está asociada a la fertilización o no de los estanques, dada su abundante presencia en el fertilizante utilizado (Figura 18a y 28).

La distribución de esteroides varía poco entre las muestras. Esta relativa uniformidad refleja la dominancia del fitoplankton como fuente primaria, puesto que las bacterias apenas biosintetizan esteroides. No obstante, las razones estanoles/esteroides parecen indicar la presencia de niveles elevados de biomasa bacteriana heterotrófica. En los sedimentos de los estanques que recibieron el cultivo es más abundante la presencia de coprostanol y etil-coprostanol, marcadores de la contribución de metabolitos de MO.

Se aprecia en todo caso una cierta variabilidad en la importancia relativa de esteroides menores, que nos permite avanzar que se ha producido una mayor diversidad de contribuciones.

Tabla X . Naturaleza química de los esteroides individuales identificados en las distintas muestras.

a'	5 β -cholestan-3 β -ol
a	5 β -cholestan-3 α -ol, (coprostanol)
b	27-nor-24-cholesta-5,22-dien-3 β -ol
c	cholest-5-en-3 β -ol, (cholesterol)
d	5 α -cholestan-3 β -ol, (cholestanol)
e	24-methylcholesta-5,22-dien-3 β -ol, (brassicasterol)
f	24-methylcholest-22-en-3 β -ol
g	24-methylcholest-5-en-3 β -ol, (campesterol)
h	24-methylcholestan-3 β -ol, (campestanol)
i	24-ethylcholesta-5,22-dien-3 β -ol, (stigmasterol)
j	24-ethylcholest-22-en-3 α -ol, (stigmastanol)
k	24-ethylcholest-5-en-3 β -ol, (β -sitosterol)
l	24-ethylcholestan-3 β -ol, (β -sitostanol)
m	4 α -23,24-trimethylcholest-22-en-3 β -ol
n	4 α ,23S,24R-trimethylcholestan-3 β -ol
p	24-methylcholest-7-en-3 α -ol (fungisterol)
q	24-ethylcholest-7-en-3 β -ol.

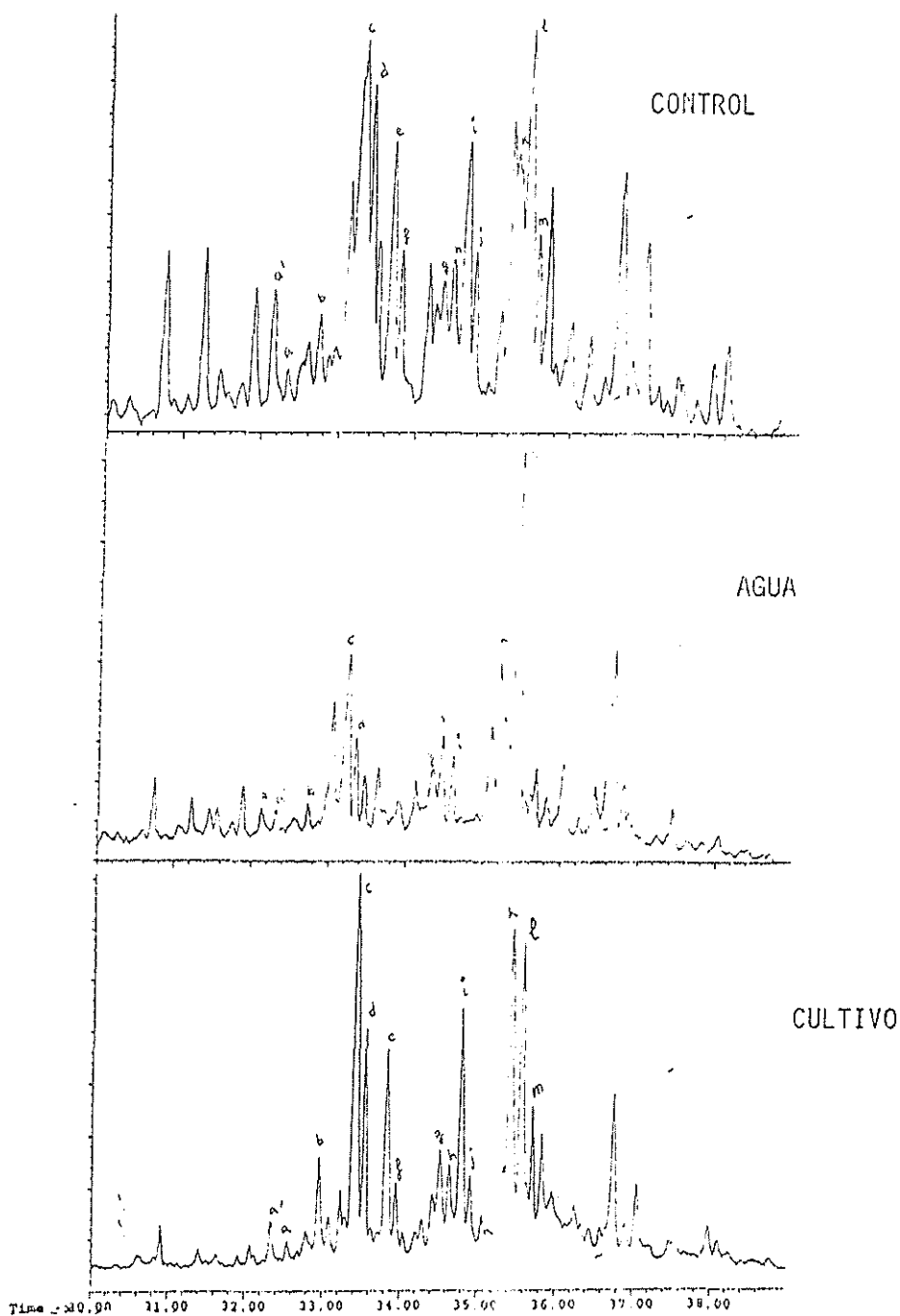


Figura 27. Cromatogramas de Ión Total de la fracción de esteroides obtenidas de las muestras tomadas en el estanque CONTROL (a), en el del manejo de agua (b) y en el del cultivo (c).

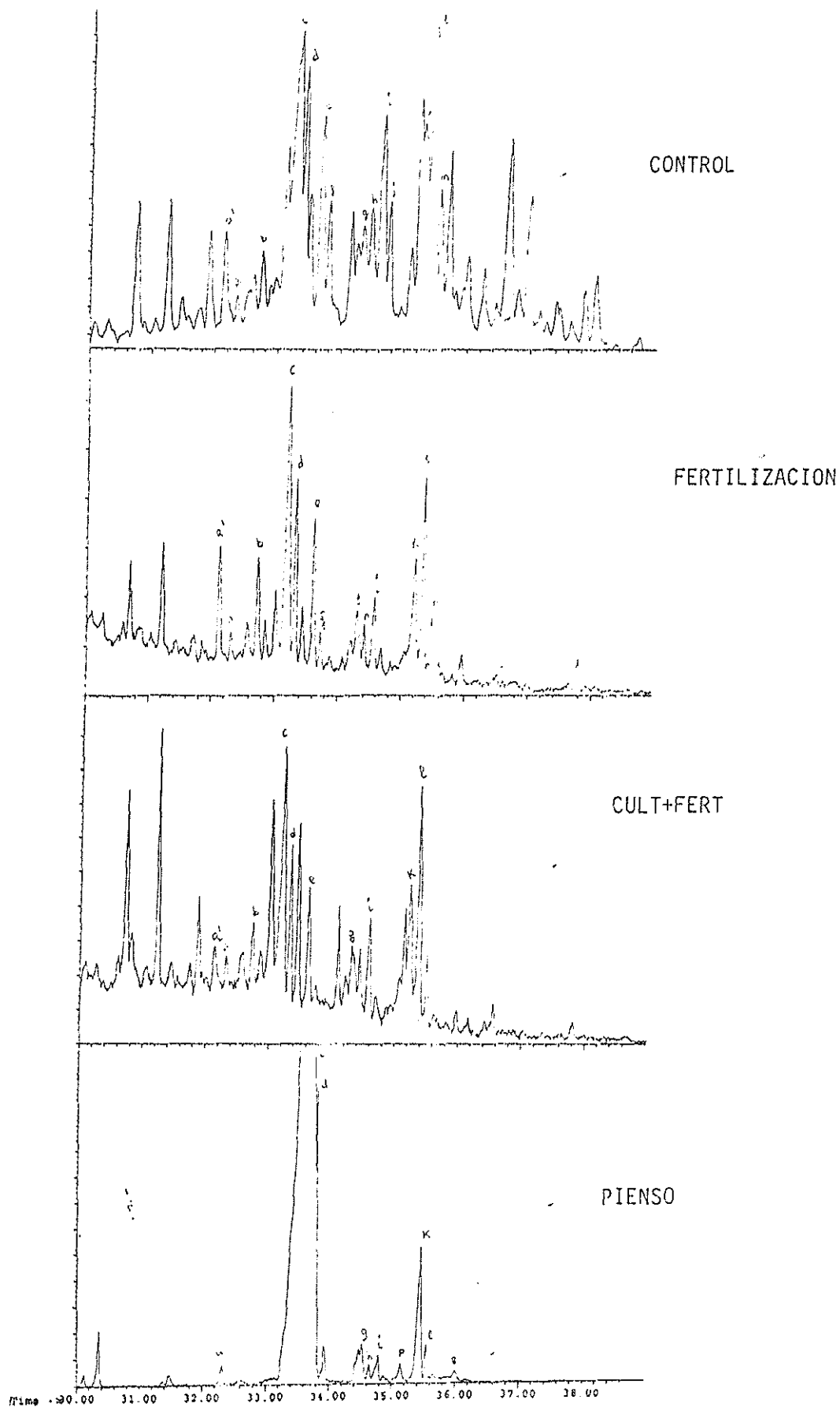


Figura 28. Cromatogramas de Ión Total de la fracción de esteroides obtenidas de las muestras tomadas en el estanque CONTROL (a), en el fertilizado (b), en el cultivado y fertilizado(c) y en la muestra de fertilizante (d).

II .4 OTROS ANALISIS DE SEDIMENTOS ACUICOLAS

Los contactos establecidos con el *Centre de Recherche en Ecologie Marine et Aquaculture de L'Houmeau, CNRS-IFREMER*, (Francia), a través del Dr. Hussenot, cristalizaron en el estudio de dos muestras de sedimentos suministrados por el grupo francés, siguiendo nuestros procedimientos. En concreto se han analizado dos muestras de sedimentos que procedían de dos estanques de cultivo (denominados "A" y "B"), que se encontraban en condiciones muy diferentes en cuanto a su grado de contaminación y estado redox.

En la tabla XI se presentan los resultados de pH, carbonatos y conductividad eléctrica, en la tabla XII los contenidos en macronutrientes, oligoelementos y metales pesados, y en la tabla XIII los contenidos en Materia Orgánica Total (MOT) y extracto lipídico, y la distribución de éste en subfracciones neutras y ácidas.

En las figuras 29 y 30, se presentan los Cromatogramas de Ión Total de las respectivas fracciones neutras y ácidas. Mientras en estas últimas existen relativamente pocas diferencias, las fracciones neutras (Figura 29) son muy diferentes. En la fracción neutra del estanque A, se detectaron series de compuestos contaminantes procedentes de detergentes y surfactantes, que demostraban claramente el input de aguas residuales.

Por otra parte, dadas las diferentes condiciones redox de los estanques, se hizo un estudio específico de la presencia de componentes azufrados en los mismos. Para ello se llevó a cabo

Table XI . Some physico-chemical parameters.

SAMPLE	pH	CO ³ Ca (%)	CEpast (dS/m)
A	7.50	5.00	15.74
B	7.50	9.00	19.00

Table XII . Macronutrients, oligoelements and heavy metals contents in the sediment samples.

	A	B
N (%)	0.188	0.152
P (%)	0.079	0.076
K (%)	2.51	2.90
Mg (%)	1.66	1.40
Ca (%)	4.12	5.97
Na (%)	3.61	2.65
Cu (ppm)	15	20
Fe (ppm)	36660	43226
Mn (ppm)	273	340
Zn (ppm)	91	106
Cr (ppm)	63	72
Ni (ppm)	41	50

Table XIII. Total organic matter (TOM) and lipid contents of the sediment samples.

SAMPLE	TOM (%) (*)	LIPID EXTRACTS (**)	PARTITION OF THE LIPID EXTRACT	
			NEUTRAL (%)	ACIDIC (%)
A	3.50	0.70	79	21
B	3.53	0.81	44	56

(*) Total dried sediment=100% W/W
(**) TOM=100% W/W

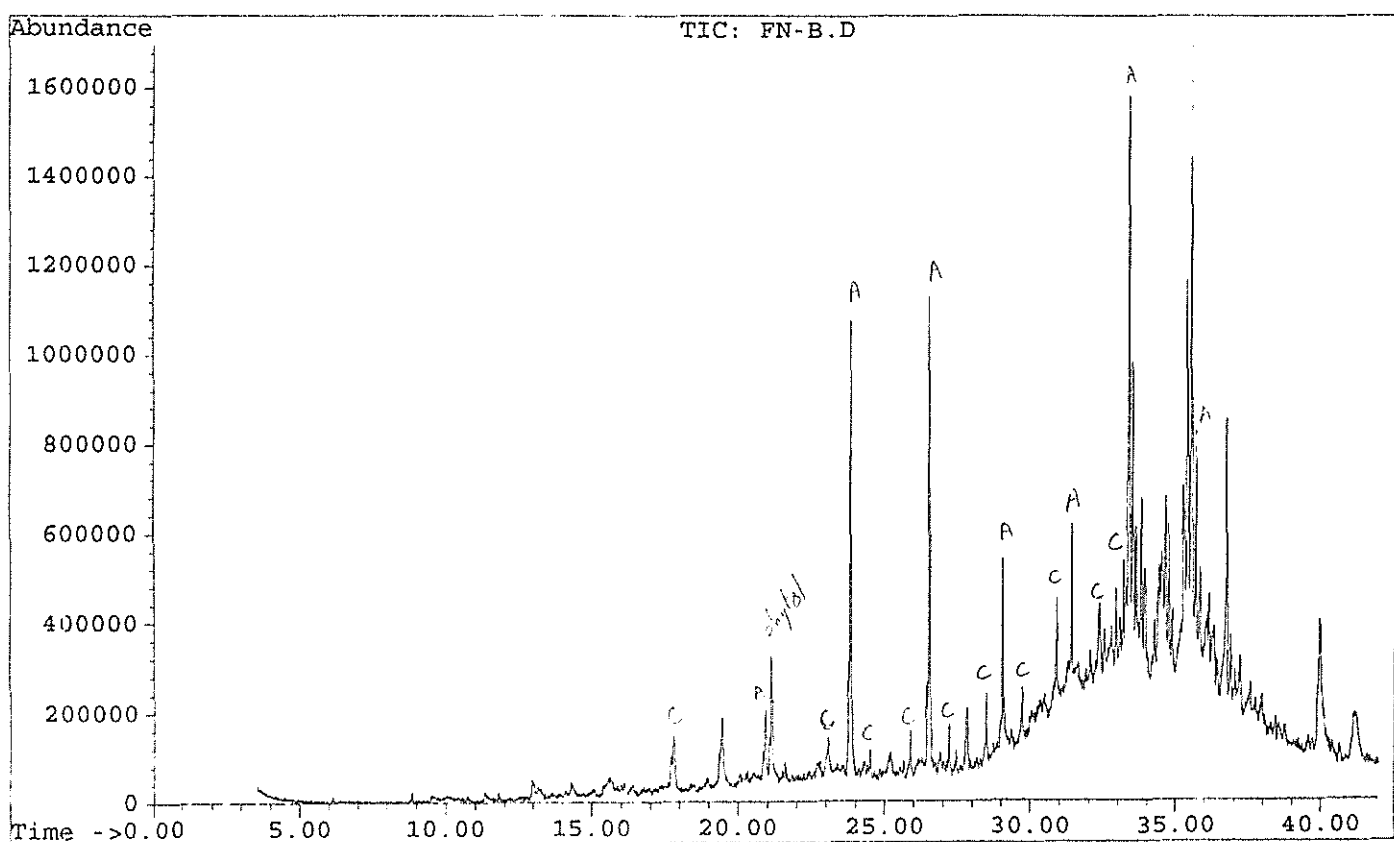
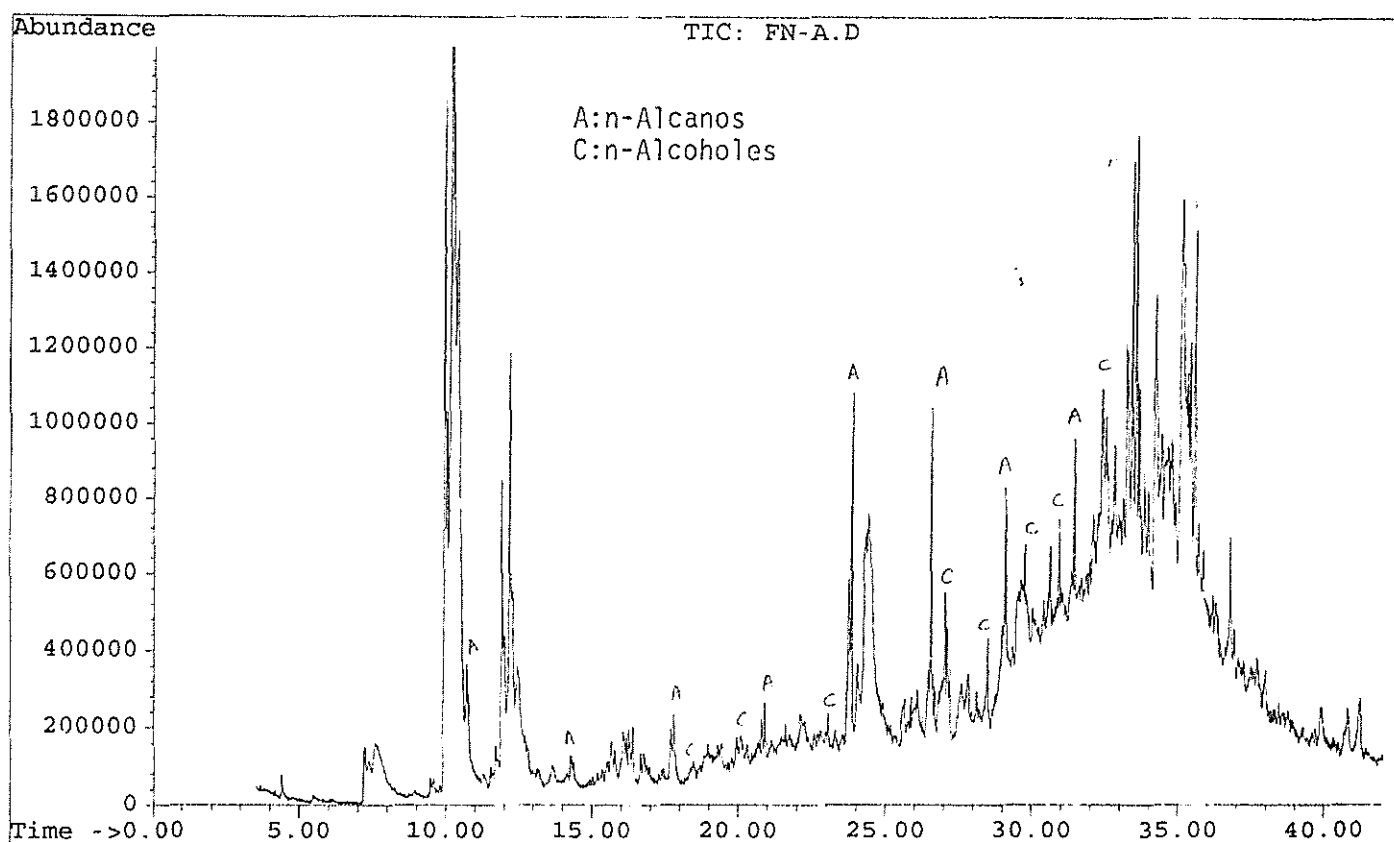


Figura 29. Cromatogramas de Ión Total de las fracciones neutras de la muestra A (a) y de la muestra B (b)

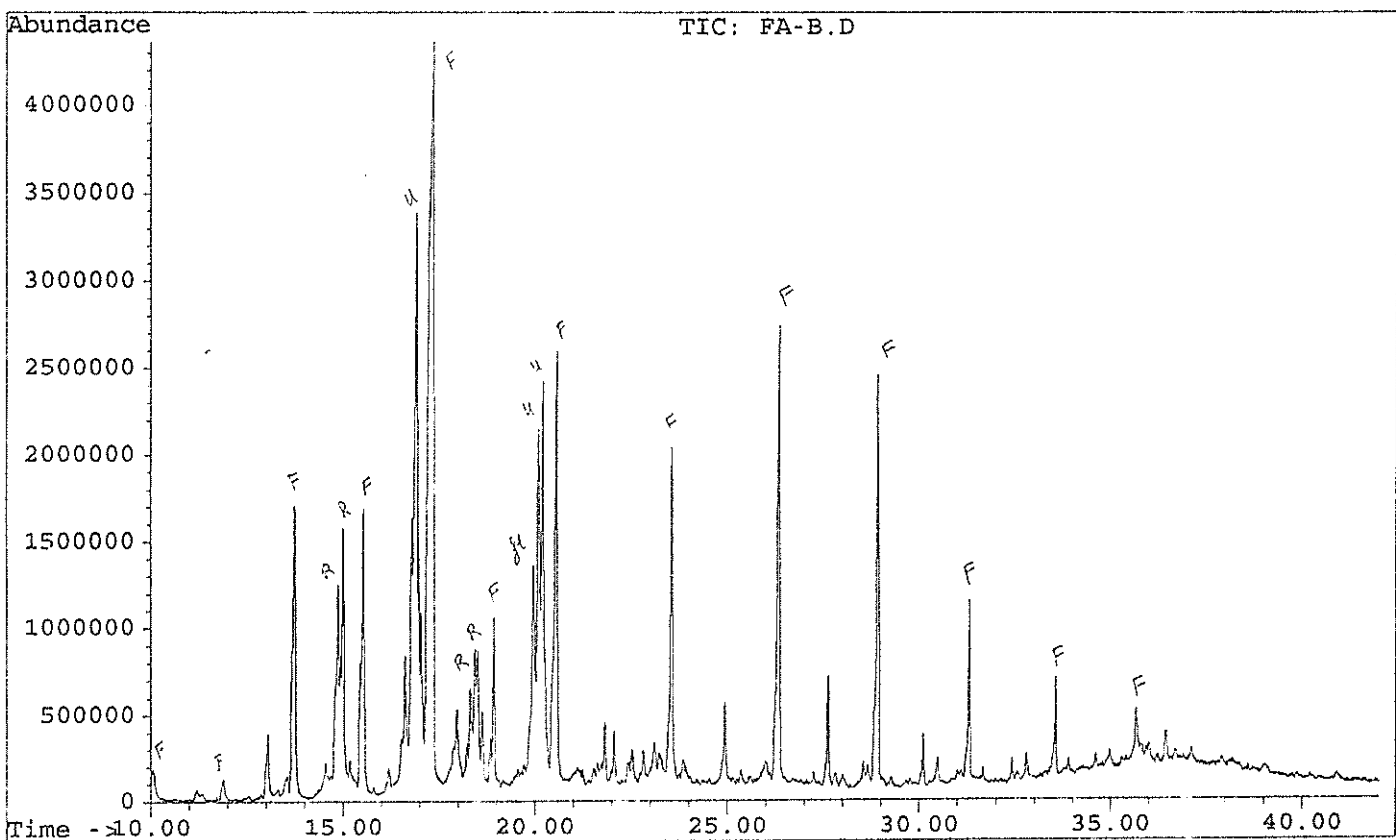
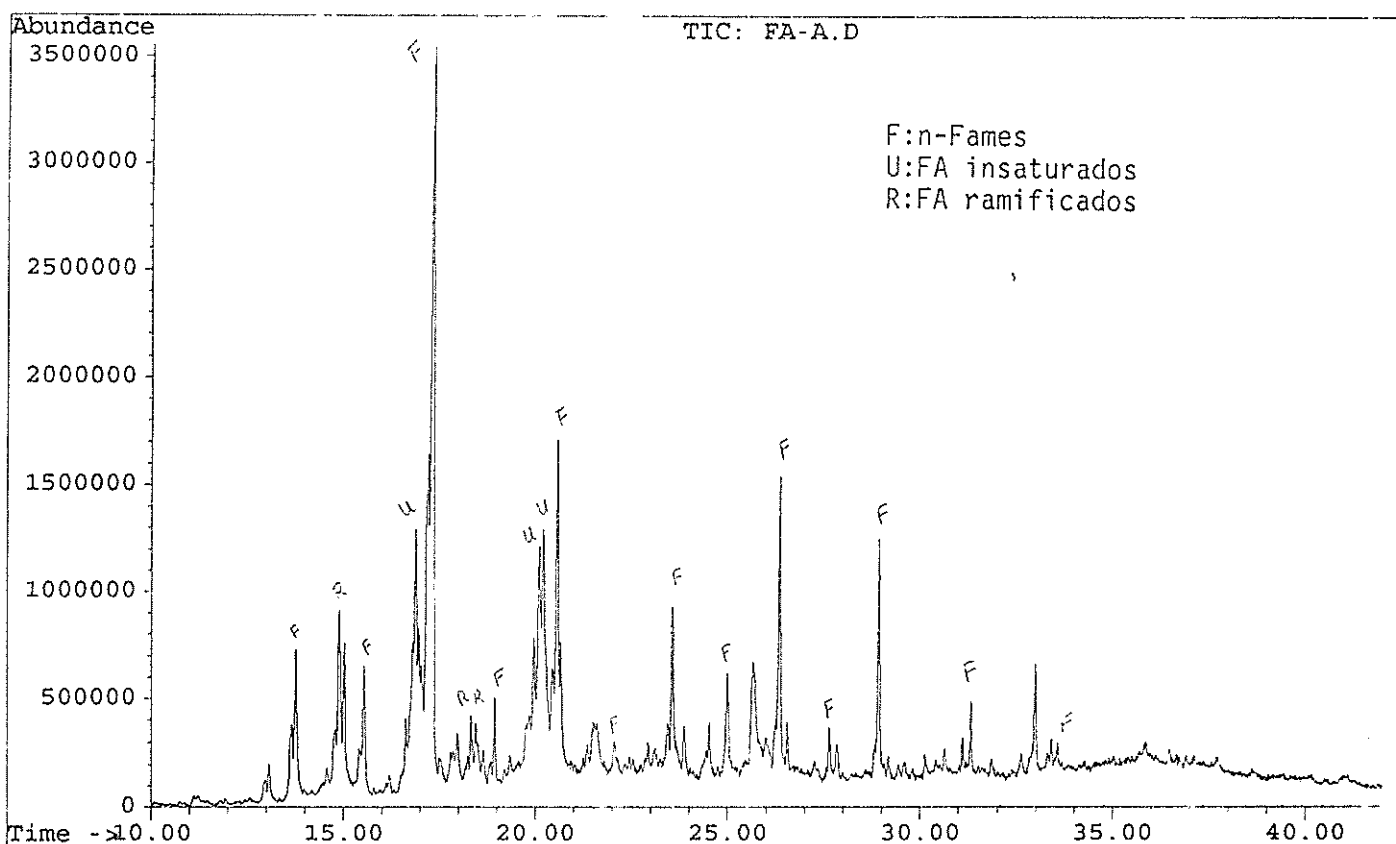
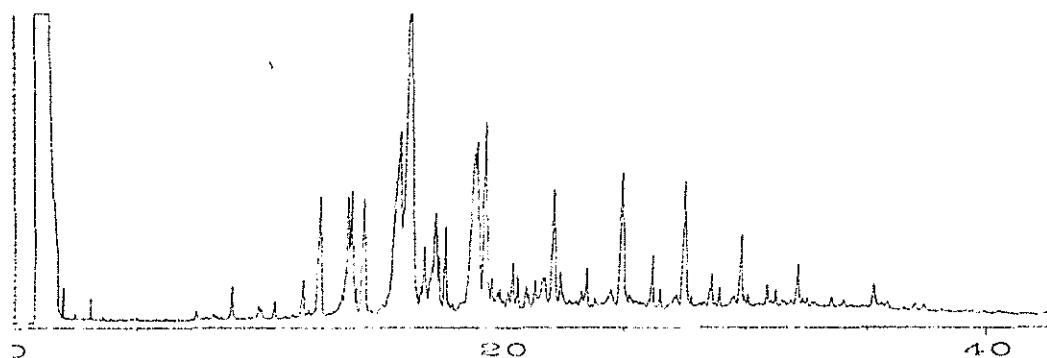


Figura 30. Cromatogramas de Ión Total de las fracciones ácidas de la muestra A (a) y de la muestra B (b)

el análisis cromatográfico tras la calibración de un detector fotométrico de llama (FPD), especialmente sensible a la determinación de compuestos orgánicos azufrados. De esta forma se detectaron diferencias muy significativas entre los dos estanques.

En la figura 31 se presentan las trazas por el detector FID (a) y el FPD (b) de la muestra de lípidos de B. Esta segunda traza apenas fué perceptible al analizar los lípidos del sedimento A.

La discusión de estos resultados se hará conjuntamente con el Dr. Hussenot, ya que se integrarán en un estudio del medio ambiente del entorno que actualmente se lleva a cabo en L'Houmeau.



Sig. 1 in C:\HPCHEM\2\DATA\TV-R\FB-B.D

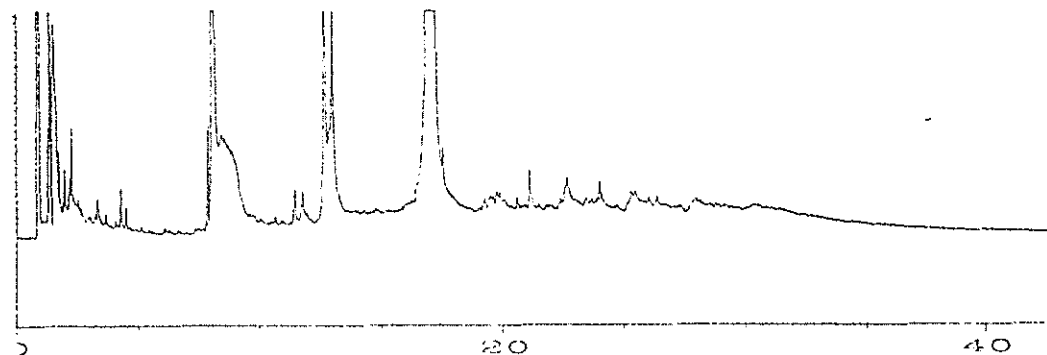


Figura 31

III. ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS

- Asistencia a reuniones técnicas.

El personal investigador adscrito a este convenio ha intervenido activamente en diversas reuniones técnicas, organizadas por la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. Así en "Las Jornadas Técnicas en Investigación y Desarrollo Tecnológico, Pesquero y Acuícola en Andalucía", que tuvieron lugar los días 28-29 de Octubre de 1993, se hizo una presentación pública de los resultados más relevantes obtenidos hasta la fecha, y se contactó con otros investigadores para la aplicación de nuestras técnicas de estudio al análisis de problemas puntuales.

Asimismo en "La Reunión Técnica sobre Innovación y Demandas de I + D Tecnológico en Acuicultura", celebrada el día 10 de Febrero de 1994, tuvimos ocasión de discutir la importancia del estudio de la calidad del medio físico para garantizar la productividad de los sistemas acuícolas.

- Asistencia a Congresos

Los principales resultados parciales obtenidos hasta ahora han sido presentados en dos Congresos Internacionales.

En Septiembre de 1993 asistimos al *XI International Symposium on Environmental Biogeochemistry*, en el cual presentamos un cartel de título "**Physico-chemical characteristics of organic matter deposits in fish aquaculture ponds**", en el que se hacía una descripción detallada de las características de muestras de origen diverso. Del correspondiente manuscrito se incluyó una copia en el Informe de Progreso correspondiente al

segundo semestre de 1993.

En Marzo de 1994 presentamos un cartel en *Bordeaux Aquaculture '94*, de título "*Lipidic deposits in sediments from aquaculture ponds*", en el que se anticipaban los resultados preliminares de la experiencia de manejo. Además se presentó un resumen extendido sobre el mismo trabajo, que será publicado en el número de Junio de la revista "*European Aquaculture*". Una copia de dicho resumen se presenta como anexo en este Informe.

La asistencia a estos dos Congresos nos ha permitido dar a conocer nuestro trabajo, así como relacionarnos con otros investigadores, cuyos temas de estudio están relacionados de alguna manera con el nuestro.

- **Visita al Centre de Recherche en Ecologie Marine et Aquaculture de L'Houmeau, CNRS-IFREMER, Francia.**

Durante el viaje realizado para asistir a *Bordeaux Aquaculture '94*, la becaria **Angela MANCHA JIMENEZ** realizó una corta estancia en el *Centre de Recherche en Ecologie Marine et Aquaculture de L'Houmeau, CNRS-IFREMER*, Francia, invitada por el Dr. Jérôme Hussenot, que le permitió conocer las instalaciones de dicho Centro y los trabajos que en él se realizan.

Asimismo, tuvo ocasión de discutir con el Dr. Hussenot los resultados obtenidos al analizar las muestras de sedimentos suministradas por él, anteriormente presentados.

Por otra parte, **Angela MANCHA** participó en un seminario con asistencia de investigadores del citado Centro (Jean Louis Martín, Robert Galois, entre otros) en el que se discutió la importancia e interés del análisis del material lipídico como medida de la calidad ambiental de los sistemas acuícolas.

- Cursos

Financiado por el Convenio, Angela Mancha ha realizado el Curso "Medida de Contaminantes Químicos Ambientales. Contaminantes Orgánicos", impartido por el Instituto de Estudios de la Energía, C.I.E.M.A.T., Madrid, con una duración de 26 horas lectivas, durante el 22-26 de Marzo de 1993.

IV. PREVISIONES DE FUTURO

Entre las actividades que hemos programado para el próximo semestre figura en lugar prioritario la de diseminar los principales resultados y conclusiones obtenidos hasta ahora en revistas especializadas. Con tal fin, hemos previsto ultimar la discusión de los datos obtenidos en la experiencia de fertilización (complementando con una revisión exhaustiva de la bibliografía actual la que se avanza en el presente informe), para elaborar en colaboración con los técnicos de Pemares en el CICEM "El Toruño", un manuscrito conjunto correlacionando la información sobre la dinámica del sedimento con la de los parámetros ambientales medidos en la columna de agua y con la actividad del bentos.

Por otra parte, se ha programado la repetición del muestreo efectuado en Junio de 1992 en algunos puntos concretos (concretamente en el río San Pedro, en el caño de Sancti Petri, en las reservas de agua y en el estanque Z.2.3) para analizar la potencial alteración con el tiempo (y sus causas) de condiciones ambientales primarias, susceptibles de manifestarse en el medio sedimentario. Estos análisis y la presentación de los datos comparativos en un eventual manuscrito estarían terminados a la finalización del presente convenio en Diciembre de 1994.

En cuanto a la continuidad de este tipo de investigaciones a más largo plazo, tenemos previsto discutir la posible elaboración de un nuevo Convenio, con líneas de actuación adecuadas a los objetivos básicos del reciente Programa Sectorial de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Pesquero de

Andalucía (PSIAPA, 1994-1997).

De forma genérica, cabría enmarcar el futuro Proyecto de Investigación, entre aquellos dedicados a estudiar los factores que influyen y/o controlan la calidad de los sistemas acuícolas, o, lo que es equivalente, entre los que se preocuparan de integrar en el manejo de los sistemas productivos la conservación de los recursos renovables y el respeto a los ecosistemas.

Concretamente, algunas líneas programáticas de las señaladas en el PSIAPA que pueden considerarse son las siguientes :

II.4. Alimentación en Acuicultura (Investigaciones sobre la calidad de piensos alternativos a los existentes en el mercado)

III.4. Geoquímica del sedimento en ecosistemas marinos

III.7. Interrelación entre la Acuicultura y el Medio Ambiente

IV.3. Estudio de la calidad del medio marino

V.2. Diseño, proyección y técnicas de mantenimiento de instalaciones (En particular, estudio de acumulaciones de materia orgánica particulada en filtros, y evaluación de la eficacia de los mismos.)

Estas sugerencias son sólo un ejemplo de líneas de investigación que interesa cultivar en las que se aprovecharía la experiencia adquirida en los últimos años y la formación específica de personal científico especializado, uno de los logros más importantes del presente Convenio.

ANEXO

Manuscrito original presentado en Bordeaux Aquaculture'94.

LIPIDIC DEPOSITS IN SEDIMENTS FROM AQUACULTURE PONDS

Mancha, A., González-Vila, F.J., Del Rio, J.C., Bautista, J.M.
Martin, F., Verdejo, T.

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, C.S.I.C.
P.O. Box 1052, 41080-Sevilla, Spain

Introduction

The amount and quality of the organic matter (OM) present in aquatic sediments, and particularly the molecular composition of the lipid fraction, provides useful information about the original sedimentary organic input and the subsequent processes of alteration to which they have been subjected (1). Likewise the OM accumulated in aquaculture ponds might reflect their environmental quality, as well as any possible alteration induced by management practices.

In this communication we present preliminary results on the influence of an experiment of benthic fertilization (low protein feed, 1 g/m²/day) to enhance the grow of shrimps, *Penaeus japonicus*, (5/m³) on the lipidic composition of sediments taken from the productive ponds.

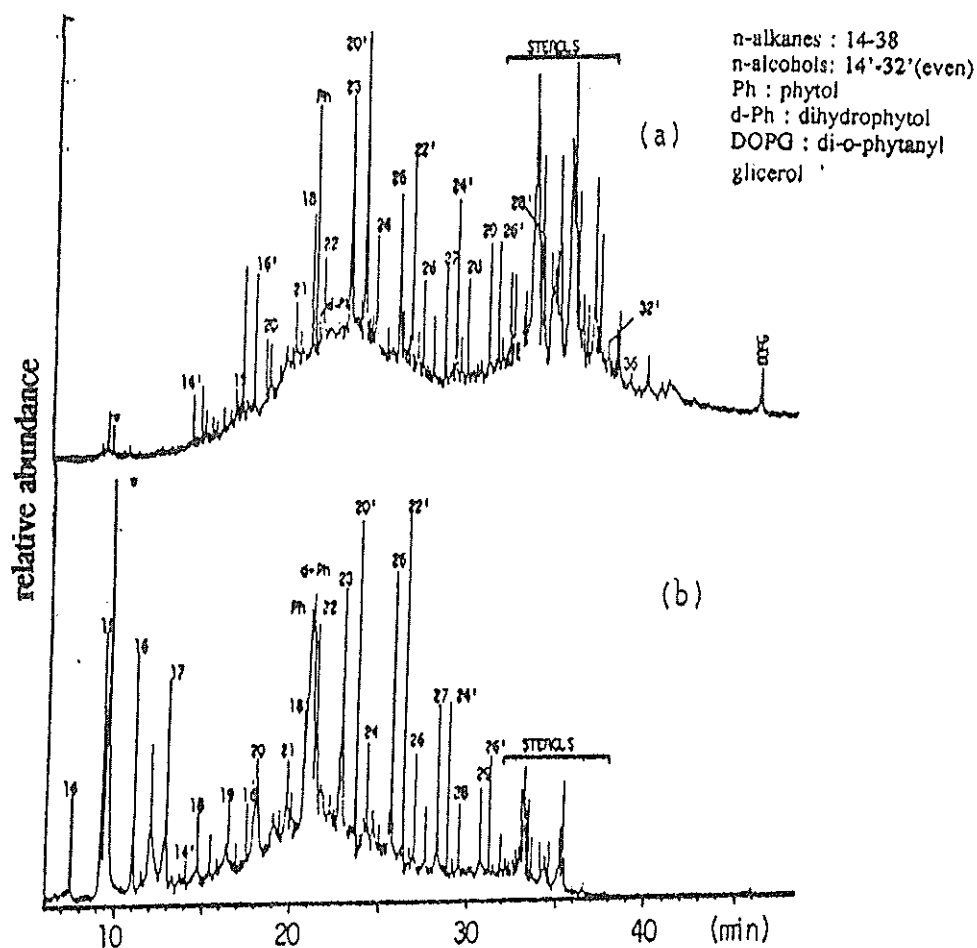
Material and methods

The samples were taken at the sediment surface, immediately frozen to prevent microbial growth and freeze-dried. Oxidizable total organic matter (TOM) was determined by oxidation with K₂Cr₂O₆.

The sedimentary lipids were extracted, saponified and fractionated into neutrals and acidic fractions, which were subsequently analyzed by GC and GC-MS after derivatization with diazomethane and BSTFA. Experimental details were as previously described (2).

Results and discussion

Quantitative determination of TOM and lipid extracts in the ponds before and after the fertilization treatment showed not significant variations. However, the composition of lipids vary both quantitatively and qualitatively. As an illustrative case, Fig. 1 show the total ion chromatograms (TIC) of the neutral (N) fractions of the lipids extracted from a pond before (a) and after (b) the experiments.



The distribution of the main series of compounds identified (hydrocarbons, alcohols, fatty acids, hydroxy acids and sterols) were modified by the treatments. Such differences reflects the relative influences on the sediment of phytoplakton blooms, microbial reworking, animal metabolisms and external inputs.

Acknowledgement

We are indebted to Pemares-Junta de Andalucia for financial support.

References

1. Meyers, P.A. and Ishiwatari, R., *Org. Geochem.*, 20, 867-900, 1993
2. Gonzalez-Vila, F.J., Del Rio, J.C., Mancha, A., Bautista, JM and Martin, F., *Biogeochemistry* (in press)